

ANA FILIPA CARRIÇO BELO

**AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ERITROCITÁRIOS
MCV, MCHC E RDW E A SUA COMPARAÇÃO
COM A RESPOSTA RETICULOCITÁRIA EM
CÃES E GATOS ANÉMICOS**

Orientador: Prof. Doutor Luís Lobo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

ANA FILIPA CARRIÇO BELO

**AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ERITROCITÁRIOS
MCV, MCHC E RDW E A SUA COMPARAÇÃO
COM A RESPOSTA RETICULOCITÁRIA EM
CÃES E GATOS ANÉMICOS**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias, no dia 10 de dezembro de 2015,
perante o júri, nomeado pelo Despacho de
Nomeação nº 456/2015, de 4 de dezembro de
2015, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof.^a Doutora Margarida Alves em
representação da Prof.^a Doutora
Laurentina Pedroso

Arguente:

Prof.^a Doutora Nazaré da Cunha

Orientador:

Prof. Doutor Luís Lobo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

Ao Gaspar, o cão mais corajoso que tive o
prazer de conhecer. E amar.

Agradecimentos

Esta tese e todo o percurso que a antecedeu não teriam existido se não fosse pelo contributo e carinho daqueles que me acompanharam. Como não poderia deixar de ser, fica aqui registado o meu genuíno agradecimento.

Ao Dr. Luís Lobo e ao Dr. Amândio Dourado, pelo apoio, transmissão de conhecimentos e quantidade astronómica de paciência. Este trabalho não é meu, é nosso.

À Dra. Inês Viegas pela enorme dedicação, boa vontade e tempo despendido.

À Dra. Paula Brilhante Simões pelo auxílio e tempo record a responder às minhas perguntas.

À Dra. Odete Vaz, Dr. Nuno Proença, Dra. Patrícia Cruz, Dr. Gonçalo Petrucci, Dra. Tatiana Lima, Dra. Carla Monteiro e Dra. Cátia Sá, um sincero obrigado pelos conhecimentos transmitidos e bons momentos proporcionados no Hospital Veterinário do Porto. A todo o staff fantástico, que me acolheu de braços abertos e me viu sair com lágrimas nos olhos. Obrigada por me fazerem aspirar a ser uma pessoa melhor, tanto a nível profissional como pessoal.

À Faculdade de Medicina Veterinária da ULHT. Ao Professor Pedro Almeida, na certeza de que serei melhor veterinária graças ao que me transmitiu. À Professora Ana Lúcia pelas palavras doces e sorriso sempre presente. À Professora Ana Oliveira, por todo o apoio. À enfermeira Carla, por ser uma presença constante.

Aos meus pais José e Isabel, pelo voto de confiança, sacrifício e acima de tudo apoio incondicional. Não há dimensão de palavras que expresse a gratidão que sinto, não só nesta etapa, mas em toda a minha vida. Estar-vos-ei eternamente grata.

Ao Diogo e ao Bruno, porque a vida é muito mais fixe com irmãos e isto sem vocês seria uma seca. Obrigada por serem meus amigos e um exemplo a seguir.

Aos meus avós Artur, Benvinda, Idália e Maria. Se o papel dos avós é amar os netos, vocês com certeza souberam demonstrá-lo. À Ana, Miguel, João, Mariana, tia Alzira e Lucília. Ao tio Carlos, tia Bia e Carlitos. À Tânia e à Mélanie. A família é a base daquilo em que nos tornamos e se hoje sou uma pessoa íntegra, é graças a vocês.

Aos meus irmãos de quatro patas... Este sonho só existe porque vocês apareceram na minha vida. Ao Vata, onde tudo começou. Ao Salvador, o meu melhor amigo. À Flávia, Carlota e Blackie. À Kikas, Rafaela, Pongo, Mimi, Maria e Gaspar. Ao Bernardo e à Bianca. À Olívia e à Matilde. Ao pequeno Charlie, a prova de que o tamanho não importa. E até aos passarinhos.

Nuno... A dedicação e o apoio que me deste nesta fase, o entusiasmo desmedido por aquilo por que tenho lutado, não roçam sequer o conceito ‘agradecível’. Não são mais, no entanto, do que o reflexo daquilo que tens sido para mim nestes quase três anos. Obrigada por todo o apoio e paciência, obrigada por não me deixares baixar os braços, obrigada por mos levatares quando os deixo cair. À família do Nuno pela simpatia e carinho com que me acolheram desde o início junto deles.

Aos meus amigos! Nenhum caminho é longo demais quando um bom amigo nos acompanha. Aos meus colegas de estágio Carolina, Daniela, Catarina, Paula, Flávia, Filipe e Rui, por quem nutro um enorme carinho. Foram a minha família durante o estágio e tornaram tudo muito mais *homy*.

À Diana Loira (Best!), à Diana Morena e à Paulinha, as minhas eternas amigas da faculdade. À Sílvia e ao Vítor, à Filipa, ao Alex. Longe mas perto. Todos me fazem sentir que norte é sinónimo de casa. À Teresa Favolas, companheira de muitas horas de estudo, copos e cumplicidade. À Patrícia e à Catarina, colegas exemplares, sempre com uma palavra amiga. Ao Jonas, o meu amigo de sempre. À Susana e ao Choi, pela amizade e histórias. À Carina, pela força e motivação, e por ser um exemplo a seguir. À Rafaela e à Rita, pelos três anos de confidências, galhofa e estudo. Ao Pipo, por ter acreditado sempre em mim. À Pinoxa, a minha amiga mais antiga. E à Sónia, porque há histórias cujo lugar não é no passado. Todos vós fazem de mim uma pessoa mais feliz.

À Cristina, pelos mimos e paciência de santa!

De uma maneira geral, um sincero obrigado a todos aqueles que, intencionalmente ou sem darem por isso, contribuíram para a concretização do sonho que tenho desde criança.

E por fim, a todos os que querem fazer do mundo dos animais, e desculpem-me as palavras, um mundo menos reles, menos podre, menos cruel. Um enorme bem hajam!

Resumo

As anemias são frequentemente classificadas em macrocíticas hipocrómicas, normocíticas normocrómicas e microcíticas hipocrómicas com base no tamanho e teor de hemoglobina das células. Alguns estudos sugerem que os índices eritrocitários não são parâmetros fiáveis para classificar a resposta regenerativa. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia dos índices MCV, MCHC e RDW em cães e gatos anémicos tendo como referência a contagem total de reticulócitos, o método mais fiável para a avaliação da resposta regenerativa. Adicionalmente, verificou-se a prevalência de anemias regenerativas e não regenerativas da amostra, bem como as diferentes etiologias na origem da anemia.

A amostra foi dividida em duas populações, 33 cães e 26 gatos. Foram utilizados os testes de Pearson, Spearman, ANOVA e Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos sugerem que os índices eritrocitários MCV, MCHC e RDW não são fiáveis para aceder à resposta regenerativa. Dos 33 cães, 16 (49,5%) não demonstraram resposta regenerativa e 17 (51,5%) apresentaram anemia com resposta ligeira ou moderada. Na amostra felina, 21 gatos (81%) apresentaram resposta regenerativa ligeira ou moderada e 5 (19%) não apresentaram resposta regenerativa. Do total de 59 animais, a disfunção secundária da medula óssea constituiu a maior causa de anemia, principalmente por infeção ou inflamação.

Palavras-chave: Anemia, Reticulócitos, Índices eritrocitários, Medula óssea

Abstract

Anaemia is frequently classified as macrocytic hypochromic, normocytic normochromic and microcytic hypochromic on the basis of the size and haemoglobin content of the cells. Some studies suggest that red blood cell indices aren't reliable to classify the regenerative response of anaemia. The main objective of this study was to evaluate the efficacy of MCV, MCHC and RDW in anemic dogs and cats, using the reticulocyte response as term of comparison, since it's the gold standard to access the regenerative response. Additionally, we checked the prevalence of regenerative and non regenerative anaemia of the sample and the diferente etiologies of anaemia.

The sample was divided in two populations of 33 dogs and 26 cats. Pearson, Spearman, ANOVA and Kruskal-Wallis tests were used. The results suggest that MCV, MCHC and RDW are not reliable to access the regenerative status of anaemia. From the 33 dogs, 16 (49,5%) had non regenerative anaemia and 17 (51,5%) showed slight or moderate regenerative response. From the 26 cats, 21 (81%) showed slight or moderate regenerative response and 5 (19%) did not show bone marrow response. From the total of 59 animals, the major cause of anaemia was bone marrow disfunction, mainly for infeccious or inflamatory processes.

Key-words: Anaemia, Reticulocytes, RBC indices, Bone marrow

Abreviaturas, siglas e símbolos

°C – grau Celsius

AEP – Aplasia Eritróide Pura

AHIM – Anemia Hemolítica Imuno-Mediada

BFU-E – Unidade Formadora de ‘Burst’ Eritrocítica, do inglês *Burst-forming unit-erythroid*

CAMV – Centro de atendimento Médico-Veterinário

CFU-E – Unidade Formadora de Colónias Eritrocíticas, do inglês *Colony-forming unit-erythroid*

DAMNITV – Degenerativo, anómalo, metabólico, miscelâneo, neoplásico, infeccioso, inflamatório, imuno-mediado, tóxico, traumático ou associado a doença vascular

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CMP – Progenitor Mielóide Comum, do inglês *Common myeloid progenitor*

dL – decilitro

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EPO – Eritropoietina

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

fl – fentolitro

g/dL – grama por decilitro

GI – gastrointestinal

Hb – Hemoglobina

HVP – Hospital Veterinário do Porto

Hct – Hematócrito

HSC – Células Estaminais Hematopoiéticas, do inglês *Hematopoietic stem cell*

IBD – Doença Inflamatória Intestinal, do inglês *Inflammatory Bowel Disease*

IM – Imuno-mediado

IRC – Insuficiência Renal Crónica

MCH – Hemoglobina Corpuscular Média, do inglês *Mean Corpuscular Haemoglobin*

MCHC – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, do inglês *Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration*

MCV – Volume Corpuscular Médio, do inglês *Mean Corpuscular Volume*

MEP – Progenitor Eritróide-Megacariocítico, do inglês *Megakaryocyte-erythroid progenitor*

mm³ – milímetro cúbico

μL – microlitro

% - percentagem

pg – picograma

PT – Proteínas Totais

RBC – Eritrócitos, do inglês *Red Blood Cells*

RDW – Índice de anisocitose, *Red Cell Distribution Width*

RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

Índice geral

1. Introdução geral.....	13
2. O hemograma	14
2.1 Colheita de sangue	14
2.2 Contagem celular	15
2.2.1 O leucograma.....	18
2.2.2 O trombograma.....	19
2.2.3 O eritrograma.....	19
2.2.3.1 Índices eritrocitários	21
2.3 Esfregaço sanguíneo	23
2.3.1 Preparação e avaliação.....	23
2.3.2 Alterações na morfologia eritrocitária	25
2.3.2.1 Alterações da cor.....	25
2.3.2.2 Alterações do tamanho	27
2.3.2.3 Alterações da forma	27
2.3.2.4 Inclusões eritrocitárias.....	30
2.3.2.5 Disposição das células no esfregaço	31
3. Alterações do eritrograma	32
3.1 Eritrocitose.....	32
3.2 Anemia.....	33
3.2.1 Classificação da anemia.....	36
3.2.1.1 Regenerativa vs. não regenerativa ou classificação segundo a força da eritropoiese	36
3.2.1.1.1 Anemias regenerativas	40
3.2.1.1.2 Anemias não regenerativas.....	43
3.2.1.2 Classificação morfológica ou segundo o volume eritrocitário e a concentração de hemoglobina	45
3.2.1.3 Classificação pelos achados do esfregaço sanguíneo.....	46
3.2.1.4 Classificação segundo a etiologia	47
4. Materiais e métodos	48
4.1 Caracterização da amostra	48
4.2 Colheita de sangue e equipamento hematológico	48
4.3 Análise estatística	49

5. Resultados	51
6. Discussão.....	57
7. Conclusão	61
8. Bibliografia.....	62
APÊNDICES	I
APÊNDICE I – Dados da população canídeos	II
APÊNDICE II – Dados da população felídeos	IV

Índice de Figuras

Figura 1 - Hemocítmetro. Zonas de contagem dos eritrócitos (Veterinary Technician's Handbook of Laboratory Procedures, 2014)	16
Figura 2 - Máquina de hemograma BC2800Vet. Tecnologia impedância eletrónica (http://www.mindray.com/pt/products/45.html)	17
Figura 3 - Cálculo do Microhematócrito (Bellwood & Andrasik-Catton, 2014)	20
Figura 4 - Esfregaço de um cão com AHIM com evidente presença de auto-aglutinação. Coloração Wright-Giemsa (Barger, 2010)	32
Figura 5 - Presença de rouleaux no esfregaço de um gato. Coloração Wright-Giemsa (Barger, 2010).....	32
Figura 6 - Mucosa oral de cão com Hct de 9% (http://vetneuromuscular.ucsd.edu/cases/2006/nov06.html)	34
Figura 7 - Abordagem à anemia após diagnóstico (adaptado de Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed.)	35
Figura 8 - Desenvolvimento dos eritrócitos e ação da EPO (adaptado de Chalhoub et. al, 2011).....	38
Figura 9 - Em cima, reticulócitos de cão corados com novo azul de metileno; em baixo policromatófilos, o equivalente a reticulócitos, corados com Wright-Giemsa (Weiser, 2012b)	39
Figura 10 - Diagrama utilizado para a classificação das anemias	50
Figura 11 - Distribuição da variável MCV, Cães	51
Figura 12 - Distribuição da variável MCHC, Cães	51
Figura 13 - Distribuição da variável RDW, Cães	52
Figura 14 - Distribuição da variável Total de Reticulócitos, Cães	52
Figura 15 - Resposta regenerativa da população cães	53
Figura 16 - Distribuição da variável MCV, Gatos	54
Figura 17 - Distribuição da variável MCHC, Gatos	54
Figura 18 - Distribuição da variável RDW, Gatos	54
Figura 19 - Distribuição da variável Total de Reticulócitos, Gatos	54
Figura 20 - Resposta regenerativa da população gatos.....	55
Figura 21 - Etiologias da anemia.....	56

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Intervalos de referência do eritrograma de cão e gato (Cowell & Tyler's, 2014) ...	23
Tabela 2 - Gravidade da anemia (Tasker, 2012)	35
Tabela 3 - Guidelines para avaliação da resposta reticulocitária (Fleischman, 2012)	40
Tabela 4 - Causas de hemólise (adaptado de Fleischman, 2012)	42
Tabela 5 - Causas de hemorragia (adaptado de Fleischman, 2012)	43
Tabela 6 - Causas de anemia não regenerativa (adaptado de Fleischman, 2012)	45
Tabela 7 - Valores de referência do equipamento BC-2800Vet – série eritróide.....	49
Tabela 8 - Grau de regeneração da resposta regenerativa com base na percentagem e contagem total de reticulócitos – equipamento Sysmex XT-2000iV	49
Tabela 9 - Estatística descritiva das variáveis do grupo Cães	51
Tabela 10 - Estatística descritiva das variáveis do grupo Gatos	54

1. Introdução geral

O presente trabalho surge como veículo para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária ao abrigo do regulamento da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e teve início na sequência de um estágio curricular no Hospital Veterinário do Porto. O estágio, de 6 meses, compreendeu o período entre Outubro de 2014 e Março de 2015 e incluiu o seguimento de casos nas áreas de cirurgia, medicina interna, anestesia e cuidados intensivos, reabilitação e urgências.

Ao longo deste período foi possível constatar que anemia constituiu uma patologia muito frequente em animais de companhia, o que vem de encontro ao que é descrito por Chervier, Cadoré, Rodriguez-Piñeiro, Deputte & Chabanne em 2012.

Um artigo publicado no *Journal of Feline Medicine and Surgery* em 2012 sobre anemia em gatos refere que, até à altura da sua publicação, não existiam estudos retrospectivos que abordassem sinais clínicos, etiologias e taxas de sobrevivência em gatos anémicos (Korman, Hetzel, Knowles, Harvey & Tasker, 2012).

Outra publicação levada a cabo em França em 2012 (Chervier et. al., 2012) refere que poucos estudos reportaram a prevalência das diferentes etiologias de anemia tanto em cães como em gatos. Adicionalmente, os autores alegam que faltam estudos acerca da forma como a etiologia e respetiva severidade fornecem indícios ao diagnóstico.

Os índices eritrocitários são parâmetros calculados após a contagem de eritrócitos e classificam as células com base no volume celular e no teor de hemoglobina (Hb). A abordagem morfológica tradicional classifica as anemias com base nestas características. No entanto, existem alguns estudos que demonstram que os índices eritrocitários não são sensíveis para proceder a esta classificação (Tvedten, 1999; Hodges & Christopher, 2011; Furman et. al., 2014). A classificação mostrou ainda ser suscetível consoante variações nos equipamentos utilizados (Neiger, Hadley & Pfeiffer, 2002).

Com base no referido cenário, este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- Comparação dos índices eritrocitários MCV, MCHC e RDW com a resposta reticulocitária em animais anémicos;
- Enumeração e classificação das principais causas de anemia na clínica de animais de companhia;
- Verificação da prevalência de anemias regenerativas e não regenerativas da amostra.

2. O hemograma

As técnicas de diagnóstico em hematologia são um componente essencial na investigação clínica. A interpretação do perfil hematológico, juntamente com a história clínica, alterações do exame físico, análises bioquímicas e análise da urina, permite ao médico veterinário encaminhar-se na escolha de outros exames complementares de diagnóstico eventualmente necessários. Cães e gatos apresentam um vasto leque de patologias hematológicas quando comparados com as restantes espécies veterinárias, fazendo com que o diagnóstico hematológico na clínica de animais de companhia assuma um papel particularmente importante (Torrance, 2000).

O hemograma é o exame de sangue mais requisitado na rotina laboratorial por ser prático, útil e de baixo custo (Lopes, Biondo & Santos, 2007). Proporciona a avaliação das três linhas celulares periféricas – leucócitos, eritrócitos e plaquetas – e é, por isso, a base de qualquer avaliação hematológica. A sua realização inclui as seguintes etapas:

- Colheita da amostra de sangue;
- Contagem celular, incluindo índices eritrocitários, índices plaquetários e determinação diferencial de leucócitos;
- Realização do esfregaço sanguíneo (Wallach, 2003).

A correta interpretação do hemograma subentende uma compreensão clara da fisiologia e fisiopatologia dos diversos componentes do sistema hematopoiético (Rebar, 2003).

Os intervalos de referência hematológicos devem ser estabelecidos por cada laboratório de diagnóstico; não obstante, os valores de referência publicados na literatura têm a função de servir como guia, ainda que a maioria do equipamento se faça acompanhar por intervalos próprios (Zabolotzky & Walker, 2014).

2.1 Colheita de sangue

Independentemente do exame laboratorial ou meio de diagnóstico ao qual se destina a amostra, a obtenção de resultados fidedignos começa com uma colheita correta e adequado manuseamento da amostra (Weiser, 2012c).

A colheita de sangue é feita de forma assética por venopunção e em mamíferos faz-se, habitualmente, na veia jugular, cefálica ou safena medial ou lateral (Bellwood & Andrasik-Catton, 2014). Recomenda-se a extração de uma veia central com a aplicação de vácuo

consistente, pois minimiza a probabilidade de danos à amostra. Danos aos componentes celulares do sangue são comuns e são a causa mais frequente para uma amostra pouco satisfatória. A resistência dos eritrócitos e a agregação plaquetária são imprevisíveis e variam individualmente e em processos patológicos, podendo ser minimizadas com uma técnica consistente. Em cães e gatos, a veia jugular é de fácil acesso, causa menos ansiedade ao animal que a colheita de vasos periféricos e apresenta resultados mais satisfatórios (Torrance, 2000).

Imediatamente após a colheita, o sangue deve ser vertido num tubo contendo anticoagulante. O anticoagulante EDTA apresenta a grande vantagem de conservar a morfologia celular, sendo, por isso, a primeira escolha na avaliação do perfil hematológico (Weiser, 2012c). A exceção é a pesquisa de *Mycoplasma*, uma bactéria que parasita os eritrócitos, que pode ser feita recorrendo ao anticoagulante heparina, uma vez que o microrganismo tem tendência a libertar-se dos eritrócitos quando exposto a EDTA. Outra alternativa quando se suspeita da presença do parasita é a realização do esfregaço com uma alíquota de sangue imediatamente após a colheita, antes da adição de qualquer anticoagulante (Bellwood & Andrasik-Catton, 2014).

Caso não seja possível a análise do sangue no espaço de uma hora após a colheita, deve proceder-se à refrigeração do tubo à temperatura de 4°C. Amostras armazenadas à temperatura ambiente causam aumento do MCV e hematócrito e diminuição do MCHC, das plaquetas e dos monócitos (Bourgès-Abella, Geffré, Deshuillers, Braun & Trumel, 2014).

2.2 Contagem celular

A determinação dos valores do hemograma pode ser feita por métodos manuais ou com o auxílio de métodos automáticos. As contagens manuais são feitas com um hemocítmetro ou câmara de Neubauer, uma placa de vidro com uma depressão central dividida em campos por uma fina quadrícula onde se coloca a suspensão celular. A câmara é colocada no microscópio, onde se procede à contagem (Torrance, 2000).

Para a contagem de eritrócitos, o sangue é diluído na proporção 1:200. A contagem é realizada por duas vezes em diferentes zonas da grelha e os valores obtidos em cada contagem não devem variar, no caso dos eritrócitos, mais que 10%. Se os números forem consistentes, a contagem total é calculada utilizando um fator de correção que tem em conta o volume da amostra e o fator de diluição específico para cada tipo de célula:

$$\text{Contagem RBC} = \frac{\text{média RBC} \times 10}{1000}$$

O resultado obtido equivale ao total de eritrócitos $\times 10^6/\mu\text{L}$. Possíveis erros podem ocorrer por incorreta homogeneização da amostra, impróprio enchimento do frasco para diluição, enchimento incorreto do hemocitómetro ou utilização de um hemocitómetro pouco higienizado e que interfira com a leitura (Torrance, 2000; Bellwood & Andrasik-Catton, 2014).

Para além das referidas dificuldades, o método manual é moroso e apresenta significativa margem de erro quando comparado com contagens automáticas (Becker, Moritz & Giger, 2008). Como tal, e tendo em conta a rápida evolução tecnológica dos últimos vinte anos nesta área, o equipamento utilizado para a contagem automática tem vindo a ganhar protagonismo (Weiser, 2012b).

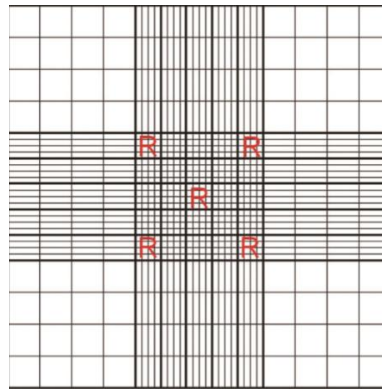


Figura 1 Hemocitómetro. Zonas de contagem dos eritrócitos (Veterinary Technician's Handbook of Laboratory Procedures, 2014)

O primeiro equipamento automático de contagem de células sanguíneas foi introduzido por Coulter há mais de meio século atrás (Graham, 2003). Desde então, a impedância elétrica é um método amplamente utilizado em vários Centros de Atendimento Médico-Veterinário (CAMVs). O princípio de funcionamento baseia-se no facto de as células serem más condutoras de corrente elétrica. Uma vez suspensas numa solução eletrolítica isotónica, boa condutora, a alteração da condutância provoca diferencial de corrente, que é proporcional ao tamanho das partículas. Conforme as células passam, são gerados pulsos. A altura dos pulsos é proporcional ao volume celular e a frequência proporcional ao número de células. A identificação das células é feita com base em limiares eletrónicos, que dependem do tamanho das células (Torrance, 2000; Moritz & Becker, 2010). Os aparelhos que utilizam o princípio de Coulter contam e

medem o volume de eritrócitos e plaquetas e a maioria inclui também contagem de leucócitos (Failace, 2009).

Hoje em dia a tecnologia dispersão da luz é amplamente utilizada em hematologia, funcionando principalmente com laser. Estes contadores utilizam um sistema de deteção eletrónico e ótico para a medição do tamanho e complexidade de cada tipo celular com base na dispersão da luz. Ao passarem pelo feixe de luz, as células causam refração, difração e reflexão; a dispersão da luz é recebida por detetores especializados (Moritz & Becker, 2010). Quando comparada com o método Coulter, esta técnica providencia mais informação acerca de cada tipo celular. A grande vantagem é que a concentração de hemoglobina e o tamanho de cada eritrócito são medidos individualmente e apresentados no diagrama de dispersão, mostrando a distribuição do MCV e da Hb de toda a população eritrocitária. Esta tecnologia fornece ainda contagem diferencial de leucócitos em diagramas de dispersão, com base nas diferentes características citoplasmáticas das células, complexidade e teor em ácidos nucleicos. Um exemplo de tecnologia laser é a citometria de fluxo (Torrance, 2000).

Finalmente, o sistema de análise quantitativa do *buffy coat* é baseado no princípio de que eritrócitos, leucócitos e plaquetas se depositam em diferentes camadas de acordo com a respetiva densidade quando submetidos a centrifugação (Torrance, 2000). Um flutuador cilíndrico com coloração é inserido num tubo capilar e expande o *buffy coat*, tingindo as diferentes camadas de diferentes cores (Moritz & Becker, 2010).

O número de equipamentos de hematologia aumentou nos últimos anos, não só nos grandes laboratórios, mas também em pequenos CAMVs. Vários equipamentos mais pequenos e a preços razoáveis foram desenvolvidos recentemente e a sua tecnologia varia entre laser, impedância, centrifugação do *buffy coat* ou uma combinação dos vários métodos (Moritz & Becker, 2010).



Figura 2 Máquina de hemograma BC2800Vet.
Tecnologia impedância eletrónica
(<http://www.mindray.com/pt/products/45.html>)

2.2.1 O leucograma

Os leucócitos ou glóbulos brancos são produzidos na medula óssea durante um período de três a sete dias. A sua libertação na corrente sanguínea é mediada por fatores humorais e pelas necessidades dos tecidos. Uma vez no sangue, distribuem-se no *pool* marginal e no *pool* circulante praticamente na mesma proporção, exceto nos gatos, onde têm, maioritariamente, preferência pelo *pool* marginal (Jain, 1993).

Os leucócitos podem ser divididos em duas categorias: granulócitos e agranulócitos. Os neutrófilos, os basófilos e os eosinófilos, por terem grânulos citoplasmáticos, constituem os leucócitos granulócitos e os monócitos e os linfócitos pertencem aos agranulócitos. Embora os cinco tipos celulares apresentem ações distintas e bastante específicas, todos têm como função identificar e responder a substâncias estranhas ao organismo, particularmente agentes causadores de doenças, como bactérias, vírus e fungos (Voigt, 2000).

De uma maneira generalizada, os neutrófilos participam na resposta inflamatória em resposta a quimiotaxia de focos inflamatórios nos tecidos e fagocitam bactérias. A função dos eosinófilos não se encontra totalmente esclarecida, mas sabe-se que contêm proteínas que se ligam e destroem parasitas e estão envolvidos na modulação de alergias e reações de complexos imunes. Relativamente aos basófilos, sabe-se que contêm histamina e heparina no interior, mas o seu papel permanece desconhecido (Weiser, 2012a).

Os linfócitos dividem-se em linfócitos B, responsáveis pela imunidade humoral, e linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular e síntese de citocinas. Os monócitos participam também na resposta inflamatória. Na corrente sanguínea encontram-se em contínua maturação, migrando depois para os tecidos onde se transformam em macrófagos e auxiliam na fagocitose de microrganismos e corpos estranhos. Cabe aos macrófagos a função de destruição de eritrócitos em fim de vida, reciclagem do ferro associado e destruição de eritrócitos patológicos (Weiser, 2012a).

Os dados obtidos no leucograma incluem: contagem celular total, contagem celular diferencial e avaliação morfológica das células do sangue periférico. O leucograma permite obter informações acerca da presença de inflamação, reações de hipersensibilidade e evidência de toxicidade. Pode manifestar alterações face a situações de stress ou de excitação, originadas por resposta a glucocorticoides endógenos e adrenalina, respetivamente (Rebar, 2003).

2.2.2 O trombograma

As plaquetas ou trombócitos não são verdadeiras células, mas sim fragmentos citoplasmáticos de células maiores, os megacariócitos, produzidos na medula óssea. A produção de plaquetas a partir de um megacariócito recém-formado demora cerca de três a quatro dias e o tempo de vida circulante varia entre três e onze dias, consoante a espécie (Jain, 1993; Voigt, 2000).

A função primária destas células é a hemostase; são essenciais na manutenção da integridade vascular, coagulação sanguínea e transporte de fatores de coagulação à superfície. Desempenham também um papel fulcral na resposta inflamatória através da ativação de substâncias quimiotáticas e libertação de proteínas e aminas vasoativas, fagocitose de pequenas partículas, aterosclerose e metástases tumorais (Jain, 1993).

A avaliação do trombograma ou plaquetas inclui contagem celular total, comentários sobre a morfologia observada no esfregaço e índices plaquetários (Rebar, 2003).

Neste trabalho o eritrograma recebe principal destaque devido à pertinência do tema e objetivos do estudo.

2.2.3 O eritrograma

O eritrograma caracteriza a população eritrocitária da amostra e compreende contagem total de hemácias, hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), índices eritrocitários e avaliação da morfologia celular.

Os eritrócitos são as células presentes em maior quantidade no sangue. A sua produção tem lugar, tal como a das restantes células sanguíneas, na medula óssea, durante um período de seis a oito dias. Em situações de maior necessidade, os eritrócitos são libertados prematuramente na corrente sanguínea entre os dias três e cinco de maturação sob a forma de reticulócitos. O tempo de vida circulante do eritrócito maturo difere com a espécie e no cão varia entre cento e dez e cento e vinte e dois dias, e no gato é de sessenta e oito dias (Voigt, 2000).

A remoção de eritrócitos velhos ou danificados é função de células do sistema reticuloendotelial e ocorre primeiramente no baço, embora o fígado também realize essa função. O ferro presente na hemoglobina e os seus componentes estruturais são retidos para serem reutilizados pela medula na formação de novas hemácias (Voigt, 2000).

A morfologia eritrocitária normal dos mamíferos compreende células arredondadas e anucleadas que coram de rosa a vermelho com as colorações rotineiras de laboratório. O eritrócito canino mede 7 μm de diâmetro e a sua concavidade é consideravelmente mais acentuada que a dos eritrócitos das outras espécies domésticas. Esta característica fornece à célula uma palidez central marcada. O eritrócito felino mede entre 5.5 e 6.3 μm e apresenta palidez central discreta quando comparada com a do eritrócito de cão (Jain, 1993; Voigt, 2000).

O hematócrito corresponde à percentagem de sangue que é constituído por eritrócitos (Weiser, 2012b). É um dos parâmetros hematológicos avaliados mais frequentemente por ser simples, rápido, económico, preciso e por fornecer informação relativamente a outros componentes sanguíneos (Voigt, 2000).

O microhematócrito é o método manual mais simples para calcular o seu valor e é vastamente utilizado na prática clínica e laboratorial. É determinado centrifugando uma amostra de sangue com anticoagulante em pequenos tubos capilares, resultando na separação das células do plasma. Por diferentes densidades, são obtidas três camadas: uma inferior preenchida pela massa de eritrócitos, uma superior preenchida pelo plasma sanguíneo e uma fina camada central denominada *buffy coat*, constituída por leucócitos e plaquetas. O valor do hematócrito é calculado consoante a medição correspondente à porção de eritrócitos compactados utilizando material designado para o efeito (Torrance, 2000; Weiser, 2012b).

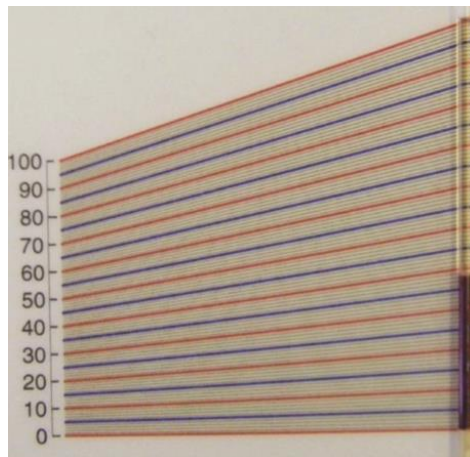


Figura 3 Cálculo do Microhematócrito (Bellwood & Andrasik-Catton, 2014)

A medição do Hct através da contagem automática está hoje disponível na maioria das práticas clínicas e utiliza o Volume Corpuscular Médio (MCV) e o total de eritrócitos (RBC) para o cálculo. É obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{Hct} = \frac{\text{MCV} \times \text{total RBC}}{10}$$

A hemoglobina é a proteína que confere o pigmento vermelho ao sangue e é responsável pelo transporte de oxigénio aos tecidos. Cada molécula de Hb é constituída por quatro grupos heme e cada um deles está associado a uma cadeia globina que contem aminoácidos dispostos em duas hélices α e duas β . Cada cadeia globina contém oito áreas helicoidais, nomeadas de A a H. O grupo heme, formado por um anel de porfirina e um átomo de ferro central, situa-se entre as hélices E e F de cada cadeia (Jain, 1993). Estima-se que um único eritrócito canino contenha cerca de quatrocentos milhões de moléculas de hemoglobina (Voigt, 2000).

Cada molécula de hemoglobina tem a capacidade de se ligar a quatro moléculas de oxigénio. A sua estrutura permite que ocorra ligação ou libertação de oxigénio consoante a concentração de oxigénio do microambiente circundante. A entrega de oxigénio aos tecidos é feita pela oxihemoglobina. A meta-hemoglobina corresponde a hemoglobina oxidada e não tem a capacidade de transportar oxigénio (Jain, 1993).

Para a massa eritróide permanecer constante no sangue e oferecer capacidade de resposta consoante as necessidades orgânicas, os níveis de oxigénio sanguíneo são monitorizados pelas células renais. Em resposta a hipóxia, as células corticais intersticiais e medulares externas respondem induzindo a libertação de eritropoietina (EPO), uma proteína cuja função é estimular a eritropoiese (Voigt, 2000). Mais detalhes sobre a EPO são abordados no tópico ‘Anemias regenerativas vs. não regenerativas ou classificação segundo a força da eritropoiese’.

O teor do sangue em hemoglobina pode ser estimado em g/dL dividindo o valor do Hct por três, ou seja, num animal com parâmetros normais, a hemoglobina ocupa aproximadamente um terço do volume total da linha eritróide.

2.2.3.1 Índices eritrocitários

Para além da contagem total de eritrócitos, medição do Hct e concentração de Hb, é possível o cálculo de índices eritrocitários que fornecem informações relativamente ao tamanho das células e ao seu teor de hemoglobina. Estes dados, incorporados com os primeiros, podem fornecer informação importante no sentido de auxiliar o clínico no diagnóstico da causa da anemia (Voigt, 2000).

Os índices eritrocitários definem a qualidade dos eritrócitos produzidos através da descrição do seu tamanho médio e do seu teor médio de hemoglobina e são os seguintes: MCV, MCHC, MCH e RDW.

O Volume Corpuscular Médio (MCV) expressa o volume médio do eritrócito individual e é calculado através da seguinte fórmula

$$\text{MCV (fl)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Total eritrócitos}}$$

onde o hematócrito deve figurar em números inteiros (%) e o total de eritrócitos deve ser apresentado nas unidades milhões/mm³. O resultado é obtido em fentolitro (fl). O resultado deve ser posteriormente comparado com os valores estabelecidos na literatura para aquela espécie. Células cujo tamanho se encontram dentro do intervalo de referência são normocíticas. Células abaixo ou acima dos valores são denominadas microcíticas ou macrocíticas, respetivamente (Voigt, 2000).

A Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) é obtida através dos parâmetros hematócrito e concentração de hemoglobina e expressa a quantidade de hemoglobina presente no total da massa eritróide. É calculada pela fórmula

$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

obtida em g/dL e onde o hematócrito deve figurar em números inteiros (%) e a hemoglobina em g/dL. Comparando com os valores da literatura, se o MCHC se encontrar dentro do intervalo de referência para a espécie, as hemácias são classificadas como normocrómicas. Se abaixo do valor de referência, são consideradas hipocrómicas. O conceito hipercromia não se aplica uma vez que os eritrócitos normais já estão saturados com hemoglobina, não existindo situações em que as células se encontram ‘demasiado saturadas’ (Voigt, 2000).

O índice eritrocitário Hemoglobina Corpuscular Média (MCH) expressa o teor de hemoglobina médio por eritrócito e calcula-se com a fórmula

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Total eritrócitos}}$$

obtido em pg, com a hemoglobina em g/dL e o total de eritrócitos em milhões/mm³. Deve-se depois comparar o valor obtido com os valores de referência obtidos na literatura. Este índice é considerado redundante e é, por isso, pouco utilizado em Medicina Veterinária (Voigt, 2000; Weiser, 2012b).

O último índice eritrocitário é o RDW, do inglês *Red Cell Distribution Width*. Este parâmetro expressa a heterogeneidade do tamanho das células, ou seja, providencia uma avaliação quantitativa do grau de anisocitose (Neiger et. al., 2002). O seu valor é obtido através da divisão do desvio padrão do tamanho dos eritrócitos pelo MCV.

A Tabela 1 apresenta valores típicos do eritrograma de cão e de gato. O parâmetro RDW não tem intervalo definido na literatura para cão e gato, sendo os valores estabelecidos por cada equipamento hematológico a alternativa.

	Cão	Gato
Hematócrito (%)	37.0-55.0	24.0-45.0
Hemoglobina (g/dL)	12.0-18.0	8.0-15.0
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	5.5-8.5	5.0-10.0
MCV (fl)	60.6-77.0	39.0-55.0
MCH (pg)	19.5-24.5	12.5-17.5
MCHC (g/dL)	32.0-36.0	30.0-36.0

Tabela 1 Intervalos de referência do eritrograma de cão e gato (Cowell & Tyler's, 2014)

2.3 Esfregaço sanguíneo

2.3.1 Preparação e avaliação

A avaliação microscópica do esfregaço sanguíneo é uma das competências mais práticas e eficientes que um clínico pode adquirir. A sua realização deve fazer parte da avaliação hematológica do paciente, sendo um complemento importante do hemograma. Embora este último forneça informação básica quanto à proporção de células no sangue, não permite detetar alterações morfológicas nas várias linhas celulares, alterações essas que podem encaminhar o clínico para o diagnóstico (Mills, 1998). Como tal, e não obstante a informação que a contagem pode oferecer, o esfregaço sanguíneo não deve ser negligenciado e deve ser incorporado na

prática clínica, associado ao hemograma. Para além da morfologia celular, a sua examinação permite ainda a visualização de inclusões celulares ou a presença de parasitas (Cowell, 2007; Wilson, 2011). Segundo Mills (1998), é um erro interpretar valores quantitativos na ausência do conhecimento da morfologia celular.

A obtenção de esfregaços com qualidade é atingida mediante prática constante (Torrance, 2000). Quanto maior a prática do operador, maior a relevância da informação obtida no sentido de alcançar um diagnóstico correto. Para além da experiência do observador, o sucesso da examinação depende da qualidade do esfregaço, da coloração, da capacidade de avaliar na localização certa e da capacidade de diferenciação de artefactos de verdadeiras alterações morfológicas (Weiser, 2012b).

Para a realização do esfregaço sanguíneo, o sangue deve ser colocado num tubo com EDTA e imediatamente agitado, de modo a evitar a formação de coágulos. Antes da remoção de uma alíquota, o tubo deve ser invertido e retornado à posição inicial pelo menos 6 vezes, de modo a assegurar que células e plasma se encontram homogeneamente distribuídos (Mills, 1998).

É aconselhável a utilização de lâminas novas (Wilson, 2011). A técnica mais utilizada consiste na deposição de uma pequena gota de sangue na extremidade de uma lâmina colocada na horizontal. Uma segunda lâmina é colocada sobre a primeira, fazendo um ângulo de 30-45°. Essa lâmina deve recuar sobre a lâmina horizontal de modo a que a extremidade contacte com a gota de sangue. Após um compasso de espera para que o sangue percorra a extremidade da segunda lâmina, esta deve deslizar sobre a lâmina horizontal num movimento rápido e único, de modo a espalhar uniformemente o sangue. A pressão na lâmina que é deslocada deve ser mínima (Weiser, 2012b) e a velocidade com que é feito deve depender da viscosidade do sangue (Mills, 1998).

Um esfregaço bem executado tem a forma de um polegar ou de uma chama, idealmente não retangular, com uma extremidade fina em forma de pena. É constituído por corpo, monocamada ou área de contagem e extremidade em forma de pena. Deve ser uniforme e progressivamente mais fino, com o corpo do esfregaço mais denso que a extremidade, sendo a parte mais densa a porção inicial onde foi colocada a alíquota (Wilson, 2011). A área de eleição para a contagem celular situa-se entre o corpo e a extremidade em forma de pena e é constituída por uma monocamada de células (Weiser, 2012b).

É essencial que a secagem do esfregaço seja feita rapidamente através de movimentos da lâmina. Uma secagem lenta, especialmente em meios muito húmidos, pode levar ao

aparecimento de artefactos ou crenação dos eritrócitos (Mills, 1998). A coloração utilizada para a avaliação dos componentes celulares é feita com recurso a colorações Romanowsky, como a Leishman ou Giemsa. Este tipo de colorações é constituído pelos corantes azul de metileno e eosina, que coram diferentes componentes celulares. A mais utilizada é a Diff-Quick, que, não sendo uma coloração Romanowsky estrita, funciona com base nos mesmos princípios. Este *kit* oferece qualidade suficiente para a coloração de esfregaços no quotidiano da prática clínica (Horobin & Walter, 1987; Torrance, 2000; Weiser, 2012b).

A observação deve ser feita com recurso a um bom microscópio e recomenda-se que a primeira visualização seja obtida através da menor lente, no sentido de identificar estruturas atípicas de grande calibre, como microfilárias. De seguida, devem identificar-se as três linhas celulares: linha branca, linha vermelha e plaquetas (Wilson, 2011).

Na avaliação das células da linha vermelha, é importante determinar se o animal se encontra anémico, se existe resposta regenerativa caso haja anemia, e se existem alterações morfológicas nos eritrócitos que possam ser sugestivas da causa (Mills, 1998).

2.3.2 Alterações na morfologia eritrocitária

A morfologia eritrocitária pode apresentar vários tipos de alterações. Para que as mesmas sejam perceptíveis, é importante um adequado conhecimento da morfologia celular normal (Cowell, 2007). Em *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, Thrall (2012b) divide as alterações morfológicas de acordo com a cor, tamanho, forma, inclusões eritrocitárias e disposição das células no esfregaço. Para uma melhor compreensão, a mesma organização será aqui apresentada.

2.3.2.1 Alterações da cor

O termo policromasia é referente a eritrócitos imaturos prematuramente libertados na corrente sanguínea, resultando em heterogeneidade da cor das células. Em colorações do tipo Romanowsky, policromatófilos são maiores e mais azuis quando comparados com eritrócitos maduros. A cor azulada advém do facto de algumas estruturas, como ribossomas e mRNA, ainda estarem presentes na célula imatura. Embora todas as células policromatófilas sejam reticulócitos, nem todos os reticulócitos aparecem como policromatófilos no esfregaço, uma vez que apenas os mais imaturos contêm RNA suficiente para corarem de azul. Como tal, embora o grau de policromasia apresente correlação com os reticulócitos circulantes e ambos

indiquem resposta regenerativa, é mais objetivo quantificar a resposta regenerativa através da contagem total de reticulócitos (Collicutt, Grindem & Neel, 2012; Thrall, 2012b).

De acordo com Collicutt et al. (2012), a contagem automática de reticulócitos é mais fiável que a contagem manual de policromatófilos, uma vez que os campos do microscópio podem variar e comprometer a aplicação das *guidelines* existentes.

Para além de ser indicativo de regeneração, o número de policromatófilos pode aumentar por intoxicação por metais pesados, como o chumbo. Embora se verifique aumento da policromasia nestes casos, a anemia é ligeira ou mesmo ausente, o que deve ser tido como critério para diferenciar a origem da policromasia (Cowell, 2007).

A policromasia é classificada em ligeira, moderada ou marcada, com base no número médio de policromatófilos por campo. Um número superior a 10 policromatófilos por campo em objetiva de imersão é considerado sinal de resposta regenerativa marcada. Esta informação deve ser interpretada em conjunto com a severidade da anemia no sentido de avaliar se a resposta regenerativa é apropriada ou não (Mills, 1998).

Hipocromia é a diminuição da intensidade da cor dos eritrócitos, resultado do declínio da concentração de hemoglobina por deficiência em ferro (Thrall, 2012b). Células hipocrómicas são pálidas no centro e têm um fino aro de hemoglobina. Não devem ser confundidas com torócitos, que apresentam também palidez central mas a transição entre a palidez e o aro de hemoglobina é mais brusca e são resultado de artefacto (Barger, 2010). Os eritrócitos de cão manifestam significativa hipocromia em anemias ferroprivas, quando comparados com os de outras espécies. No esfregaço sanguíneo de cães com anemia ferropriva podem observar-se hemácias hipocrómicas antes de os índices eritrocitários denunciarem a hipocromia (Cowell, 2007; Thrall, 2012b). Os eritrócitos de gato geralmente não expressam hipocromia, mesmo quando o défice em ferro é acentuado. A anemia ferropriva tende a ocorrer por perda de sangue lenta e crónica em animais adultos e em animais recém-nascidos devido ao baixo teor em ferro do leite. (Cowell, 2007). Pode ainda verificar-se em défice prolongado de cobre ou deficiência em vitamina B6 (Harvey, 1997).

Animais saudáveis apresentam ligeiro grau de policromasia, devido à presença normal de alguns reticulócitos circulantes.

2.3.2.2 Alterações do tamanho

As variações de tamanho celular são denominadas anisocitose e no caso dos eritrócitos podem ir até um terço do tamanho normal da célula (Cowell, 2007). A anisocitose pode ser resultado de um aumento das células (macrócitos ou eritrócitos macrocíticos), de uma diminuição das células (micrócitos ou células microcíticas) ou de uma combinação ambos. Em cães, macrócitos são apenas ligeiramente maiores que hemácias normais, contrariamente ao que se verifica nas outras espécies, cujos macrócitos são evidentemente maiores. Tal como com a policromasia, é normal que animais saudáveis tenham ligeira anisocitose devido a reticulócitos circulantes, que coram como macrócitos (Barger, 2010; Thrall, 2012b).

A causa mais comum de macrocitose é um aumento do número de reticulócitos. Verifica-se também em gatos FeLV positivos, síndromes mielodisplásicas e em algumas condições hereditárias, como a macrocitose hereditária do Caniche miniatura e *toy* ou a estomatocitose hereditária do Malamute do Alasca e do Schnauzer miniatura. A macrocitose geralmente faz-se acompanhar por um aumento no MCV (Barger, 2010; Thrall, 2012b). Pode ainda ocorrer macrocitose por armazenamento do sangue à T° ambiente.

A causa mais comum para microcitose é anemia por deficiência de ferro, mais frequentemente associada a hemorragia gastrointestinal crónica oculta (Torrance, 2000). Outras causas incluem shunt porto-sistémico, onde a patogenia da microcitose permanece desconhecida, microcitose hereditária dos Akita e Shiba Inu e anemia diseritropoiética familiar do Springer Spaniel Inglês (Barger, 2010; Frowde et. al., 2014; Torrance, 2000).

Para que microcitose seja visível no esfregaço, o tamanho dos eritrócitos tem que ser consideravelmente menor (Thrall, 2012b).

2.3.2.3 Alterações da forma

As alterações gerais na forma dos eritrócitos são designadas poiquilocitose. Esta terminologia é abrangente e não especifica as alterações propriamente ditas, sendo que a sua ocorrência varia consoante a espécie (Barger, 2010).

Aquando da descrição da forma, é essencial ser-se o mais específico e detalhado possível, já que certas alterações estão diretamente associadas a determinadas doenças. Mudanças na membrana celular, na estrutura da hemoglobina ou na arquitetura da medula óssea podem levar os eritrócitos a assumirem formas bastante específicas (Barger, 2010; Thrall, 2012b).

Dentro dos eritrócitos espiculados, que contêm uma ou mais superfícies com espículas, existem os acantócitos, equinócitos, queratócitos e esquizócitos.

Acantócitos apresentam projeções celulares com diferentes comprimentos e diâmetros entre si e são o resultado de alterações do rácio fosfolípidos/colesterol na membrana celular ou de fragmentação celular (Torrance, 2000; Barger, 2010). Em humanos estão associados a hepatopatias e são um achado recorrente em gatos com lipidose hepática. Em cães, são frequentemente associados a hemangiomas e hemangiossarcomas esplénicos (Wilson, 2011; Thrall, 2012b). Embora se desconheça o mecanismo por detrás da alteração em pacientes com hemangiossarcoma, a presença de acantócitos em cães geriátricos de raça grande, com anemia concomitante, é altamente sugestiva deste tipo de tumor (Thrall, 2012b). Estão ainda associados a shunt porto-sistémico, CID, glomerulonefrite e dietas com elevado teor de colesterol (Barger, 2010).

Equinócitos são eritrócitos espiculados com projeções curtas uniformemente distribuídas pela superfície celular. São quase sempre artefacto devido a crenação, ou secagem lenta da lâmina (Barger, 2010). Associam-se também a glomerulopatias, linfoma no cão, uremia no gato, toxicose por exposição crónica à doxorrubicina e envenenamento por mordedura de cascavel (Mills, 1998; Barger, 2010; Thrall, 2012b).

Queratócitos e esquizócitos são eritrócitos em forma de capacete e fragmentos de eritrócitos, respetivamente, e são o resultado de traumas mecânicos infligidos às células. Pensa-se que queratócitos, quando fragmentados, originem esquizócitos. Estes tipos celulares estão presentes em CID, vasculites, hemangiossarcoma, administrações prolongadas de doxorrubicina e deficiência em ferro (Wilson, 2011; Thrall, 2012b).

Existem, para além de glóbulos vermelhos espiculados, outras alterações na forma das células dignas de registo.

Esferócitos são células esféricas, tal como o nome sugere, e desprovidas de palidez central (Wilson, 2011). Embora o aparente tamanho diminuto, o seu volume é igual ao de um eritrócito normal; a forma característica que assumem deve-se à perda parcial da membrana celular sem que ocorra perda significativa de citoplasma, resultado de fagocitose secundária à presença de anticorpos ou complemento na superfície celular. Como tal, a presença de esferócitos no esfregaço sanguíneo é um indicador sensível de anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM). Este pressuposto é apenas válido para cães, já que os eritrócitos normais dos gatos apresentam menor volume e palidez central menos marcada (Torrance, 2000; Thrall,

2012b). Cowell (2007) aponta ainda esferocitose como consequência de fragmentação celular traumática, reação transfusional ou micoplasmose.

Codócitos e leptócitos são chamados ‘target cells’ devido à semelhança com um alvo. Este aspeto é resultado de alterações na proporção da superfície celular em relação ao conteúdo, criando uma zona central de hemoglobina separada do resto por um aro mais pálido (Thrall, 2012b). As alterações membranares ocorrem por desequilíbrios no rácio fosfolípidos/colesterol, tal como ocorre com os acantócitos. Codócitos e leptócitos estão presentes em pacientes com deficiência em ferro, hepatopatias com colestase e em cães submetidos a esplenectomia. Podem também ser achados em pacientes com anemias regenerativas (Torrance, 2000; Barger, 2010). Thrall (2012b) refere ainda a presença de ‘target cells’ *in vitro* secundária a excesso de contacto com EDTA. Segundo os autores, estão associadas a uma enorme variedade de alterações, não tendo, por isso, grande significado diagnóstico.

Eccentrócitos são eritrócitos cuja hemoglobina se concentrou numa porção da célula, deixando uma parte mais clara no polo oposto (INNO, 2011, 19 de Setembro). São um indicador sensível para dano oxidativo em cães, frequentes em anemia oxidativa secundária à ingestão de cebola (Torrance, 2000).

Estomatócitos, eritrócitos com palidez central em forma de meia-lua, não têm significado clínico quando em número reduzido. Estomatocitose hereditária foi reportada, como já referido, no Malamute do Alasca e Schnauzer miniatura. Pensa-se que a alteração eritrocitária esteja associada a um defeito de membrana que faz com que ocorra excessiva entrada de água e sódio nas células (Thrall, 2012b).

Eliptócitos são, como o nome sugere, hemácias elípticas. O formato é fisiológico em camelídeos e é um achado ocasional nas espécies veterinárias. Em cães está associado a glomerulonefrite e a mielofibrose, e foi descrito um caso de um cão com deficiência na proteína de banda 4.1, uma proteína do citoesqueleto responsável pela manutenção da arquitetura celular (Smith, Moore, Arens, Rinderknecht & Ledet, 1983; Hoff, Lumsden & Valli, 1985; Junqueira & Carneiro, 2008;). Em gatos, eliptocitose está associada a doença hepática, doenças mieloproliferativas e administração crónica de doxorubicina (O’Keefe & Schaeffer, 1992; Christopher & Lee, 1994;).

Por fim, existem ainda dacriócitos, células vermelhas em forma de lágrima devido a deformação nos vasos sanguíneos e que não retornaram à forma fisiológica (INNO, 2011, 19 de Setembro). São visualizadas no esfregaço de cães com esplenomegália ou síndromes mieloproliferativas (Barger, 2010).

2.3.2.4 Inclusões eritrocitárias

As principais inclusões dos eritrócitos incluem corpos de Heinz, corpos de Howell-Jolly, *basophilic stippling* e parasitas (Torrance, 2000).

Corpos de Heinz são agregados de hemoglobina desnaturada, resultado de dano oxidativo. Ao esfregaço aparecem como estruturas ligeiramente pálidas, geralmente na periferia da célula, causando protusão da membrana. Quando corados com novo azul de metileno, a coloração utilizada para os reticulócitos, os corpos de Heinz coram de azul pálido. Esta coloração pode ser utilizada para confirmar a sua presença pois torna mais fácil a visualização destas estruturas. Um escasso número de corpos de Heinz pode ser normal em gatos; quando em grande quantidade, com anemia concomitante, é sinal de dano oxidativo e toxicidade. Agentes indutores deste tipo de inclusões incluem alho, cebola, paracetamol, propilenoglicol e fenotiazinas. Menos comum mas também possível em gatos é a presença de corpos de Heinz em casos de diabetes, hipertiroidismo e linfoma (Wilson, 2011).

Corpos de Howell-Jolly não são mais do que remanescentes do núcleo de metarrubríctos, células imaturas da linha eritróide. São visualizados como pequenas estruturas basofílicas esféricas dentro da célula (Wilson, 2011). Um pequeno número é normal em gatos. Um aumento da presença de Howell-Jolly ocorre em anemias regenerativas, animais com função esplénica condicionada e animais submetidos a esplenectomia, uma vez que a remoção destas estruturas é feita pelo baço. Podem também estar presentes em caniches miniatura e *toy* com macrocitose hereditária (Barger, 2010).

O termo *basophilic stippling* é utilizado para descrever a agregação espontânea de ribossomas e polirribossomas, que resulta num aglomerado de grânulos basofílicos dentro do eritrócito. Podem ser vistos em cães e gatos na presença de anemia severa e são indicativos de resposta regenerativa. Na ausência de anemia, intoxicação por chumbo torna-se um diagnóstico diferencial (Barger, 2010).

Tradicionalmente, hemoparasitas são diagnosticados através da sua visualização no esfregaço sanguíneo (Thrall, 2012d). Os micoplasmas hemotrópicos são parasitas de pequenas dimensões, sem parede celular e que coram como gram-negativos. Tipicamente encontram-se aderidos à membrana dos eritrócitos, embora possam ser encontrados livres no plasma. No gato existem três tipos: *Mycoplasma haemofelis*, anteriormente denominado *Haemobartonella felis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. *Mycoplasma haemofelis* pode ser visualizado no esfregaço sob forma redonda, de haste ou em anel de sinete, variando de tamanho entre 0.8 µm e 1.5 µm e de disposição entre cachos ou

pequenas cadeias. O parasita ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ tem cerca de metade do tamanho do primeiro, o que torna difícil a sua identificação no esfregaço. ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ apenas foi detetado através de métodos moleculares (Willi et. al., 2005; Allison & Meinkoth, 2010).

Dois hemoplasmas parasitam os eritrócitos caninos: *Mycoplasma haemocanis*, anteriormente designado *Haemobartonella canis*, e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’. O *Mycoplasma haemocanis* mede entre 1 e 3 µm e pode apresentar, à semelhança do *M. haemofelis*, forma redonda, de haste ou anel de sinete. O ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ carece, para já, de informação, e é demasiado pequeno para ser visualizado no esfregaço sanguíneo (Allison & Meinkoth, 2010).

Babesia é um protozoário que parasita unicamente eritrócitos. As que parasitam cães podem ser agrupadas segundo o tamanho em grandes ou pequenas. A *Babesia* grande subdivide-se nas subespécies *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*. Têm até 5 µm de diâmetro, são piriformes e encontram-se inclusas nos eritrócitos. *Babesia gibsoni*, também denominada *Babesia* pequena, tem um tamanho entre 1 e 2.5 µm e é pleomórfica, variando entre anel e, não tão frequentemente, forma alongada (Macintire, Boudreaux, West, Bourne, Wright & Conrad, 2002; Allison & Meinkoth, 2010).

Cytauxzoon felis é um parasita que infesta eritrócitos e macrófagos felinos. De tamanho entre 1 e 3 µm, é relativamente pleomórfico, sendo a forma mais comum a de anel de sinete (Wagner, 1975; Allison & Meinkoth, 2010).

A não observação de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo não deve excluir a sua presença.

2.3.2.5 Disposição das células no esfregaço

O termo rouleaux é utilizado para designar um conjunto de eritrócitos agrupados como uma pilha de moedas (INNO, 2011, 19 de Setembro). Uma pequena quantidade de rouleaux é normal em cães e gatos. Quando em elevado número, estão associados a um aumento das proteínas plasmáticas, como imunoglobulinas ou fibrinogénio (Thrall, 2012b).

Rouleaux não deve ser confundido com autoaglutinação, aglomerados de eritrócitos em forma de cacho. Esta disposição resulta de anticorpos à superfície celular, sendo, por isso, altamente sugestiva de AHIM. Caso existam dúvidas em relação à distinção entre rouleaux e autoaglutinação, deve adicionar-se ao sangue solução salina isotónica em proporções que

variam de 1:2 a 1:10. Caso seja rouleaux, as células dispersar-se-ão, no caso de autoaglutinação, os aglomerados manter-se-ão (Wilson, 2011; Thrall, 2012b).

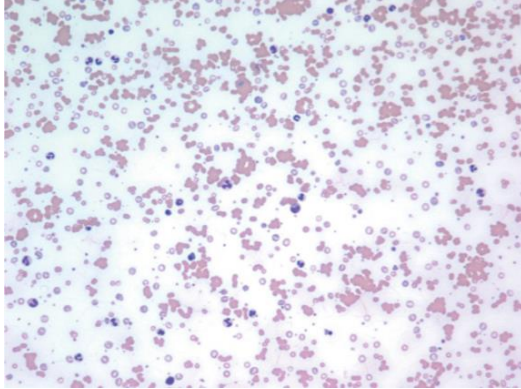


Figura 4 Esfregaço de um cão com AHIM com evidente presença de auto-aglutinação. Coloração Wright-Giemsa (Barger, 2010)

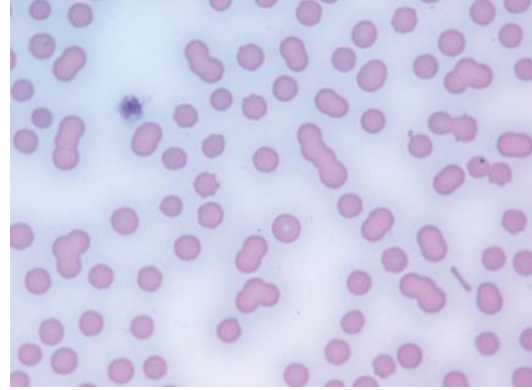


Figura 5 Presença de rouleaux no esfregaço de um gato. Coloração Wright-Giemsa (Barger, 2010)

3. Alterações do eritrograma

3.1 Eritrocitose

O termo eritrocitose é utilizado para definir um aumento da massa eritrocitária circulante e reflete-se, hematologicamente, com um hematócrito superior ao intervalo de referência (Couto, 2009). Optou-se pela utilização do termo eritrocitose ao invés de policitemia já que policitemia implica um aumento de todas as linhas celulares sanguíneas, e não só eritrócitos, situação que não se verifica frequentemente em Medicina Veterinária.

A eritrocitose pode ser classificada em relativa ou absoluta. Eritrocitose relativa é uma situação frequente em cães e gatos e ocorre devido a diminuição do volume plasmático ou redistribuição dos eritrócitos. Consequentemente, o hematócrito encontra-se aumentado. O aumento do Hct faz-se acompanhar de um aumento das proteínas plasmáticas, salvo casos em que o seu *intake* ou produção estejam diminuídos ou ocorram perdas. Eritrocitose relativa ocorre em animais com diarreia aguda, que sofreram queimaduras severas, golpe de calor ou sujeitos a prolongada privação de água, e é acompanhada por evidentes sinais de desidratação. Redistribuição eritrocitária verifica-se em episódios de contração esplénica devido a exercício, dor aguda ou excitação, levando a libertação de grande número de eritrócitos em circulação (Villiers, 2000; Thrall, 2012a).

Eritrocitose absoluta é o aumento ‘real’ do total de eritrócitos circulantes e pode ser primária ou secundária. A primária, também denominada policitemia vera, é uma doença mieloproliferativa crónica caracterizada pela produção neoplásica de precursores eritrocitários, que maturam em eritrócitos morfológica e fisiologicamente normais. A proliferação não apresenta correlação com a produção de eritropoietina, não respondendo aos mecanismos normais de feedback. Eritrocitose absoluta secundária ocorre na sequência de um aumento da produção de eritropoietina, face a situações de hipoxia, ou devido à presença de tumores (Villiers, 2000).

3.2 Anemia

Como mencionado inicialmente, anemia é um achado frequente na prática clínica (Chervier et. al., 2012). O conceito é referente a uma diminuição da massa total eritróide no sangue periférico, comparativamente com intervalos de referência obtidos para a espécie. As três variáveis da linha vermelha que determinam se um animal está anémico são o número de eritrócitos, a hemoglobina e o hematócrito. O resultado prático da anemia é uma diminuição do aporte de oxigénio aos tecidos e consequente declínio no metabolismo celular (Cain, 1977; Mills, 2000).

A anemia não é, *per se*, um diagnóstico, mas um sinal clínico associado a uma doença ou causa subjacente (White & Reine, 2009). Como tal, e considerando que pode ameaçar a vida do animal, devem ser feitos todos os esforços no sentido de identificar a sua etiologia (Couto, 2009; Chervier et. al., 2012).

Aquando da avaliação do perfil hematológico, há que considerar variações inerentes não só à espécie mas também à raça ou a determinada característica fisiológica causadora de alterações. A raça Greyhound, por exemplo, apresenta fisiologicamente valores de Hct superiores e cachorros/gatinhos e fêmeas gestantes apresentam valores inferiores, quando comparados com os intervalos de referência (Couto, 2009). Também animais desidratados podem mascarar o valor real do parâmetro, como abordado no tópico anterior.

As principais manifestações clínicas de anemia incluem letargia, intolerância ao exercício, mucosas pálidas e/ou ictéricas, hemoglobinúria e ocasionalmente picacismo, maioritariamente em gatos. Pode ocorrer ainda taquicardia e taquipneia nos casos mais severos, a primeira associada ou não a sopro cardíaco (Couto, 2009; Tasker, 2012). A duração e a

severidade dos sinais clínicos são variáveis e não estão necessariamente correlacionados com o mecanismo na origem da anemia (Tvedten, 2010).



Figura 6 Mucosa oral de cão com Hct de 9% (<http://vetneuromuscular.ucsd.edu/cases/2006/nov06.html>)

Contraditoriamente a isto, o estudo levado a cabo por Chervier et. al. em 2012 com 456 cães anêmicos concluiu que a gravidade da anemia era maior em anemias hemolíticas imuno-mediadas e menor em anemias associadas a doença inflamatória. Estes resultados sugerem que a severidade pode fornecer pistas importantes ao mecanismo etiológico.

Há uma variedade de testes iniciais relativamente simples que podem ser utilizados no sentido de investigar a severidade e causa da anemia, chegando a um diagnóstico (Tasker, 2012).

O diagnóstico geralmente tem início com a realização do hemograma e eventual esfregaço sanguíneo e avaliação reticulocitária. A Figura 7 representa um algoritmo simples demonstrativo da abordagem à etiologia (Tvedten, 2010).

O método microhematócrito é uma maneira simples, rápida e precisa de calcular o valor do hematócrito, providenciando informação não só diagnóstica mas também acerca da gravidade da anemia. Permite ainda a visualização de alterações no plasma (Tasker, 2012).

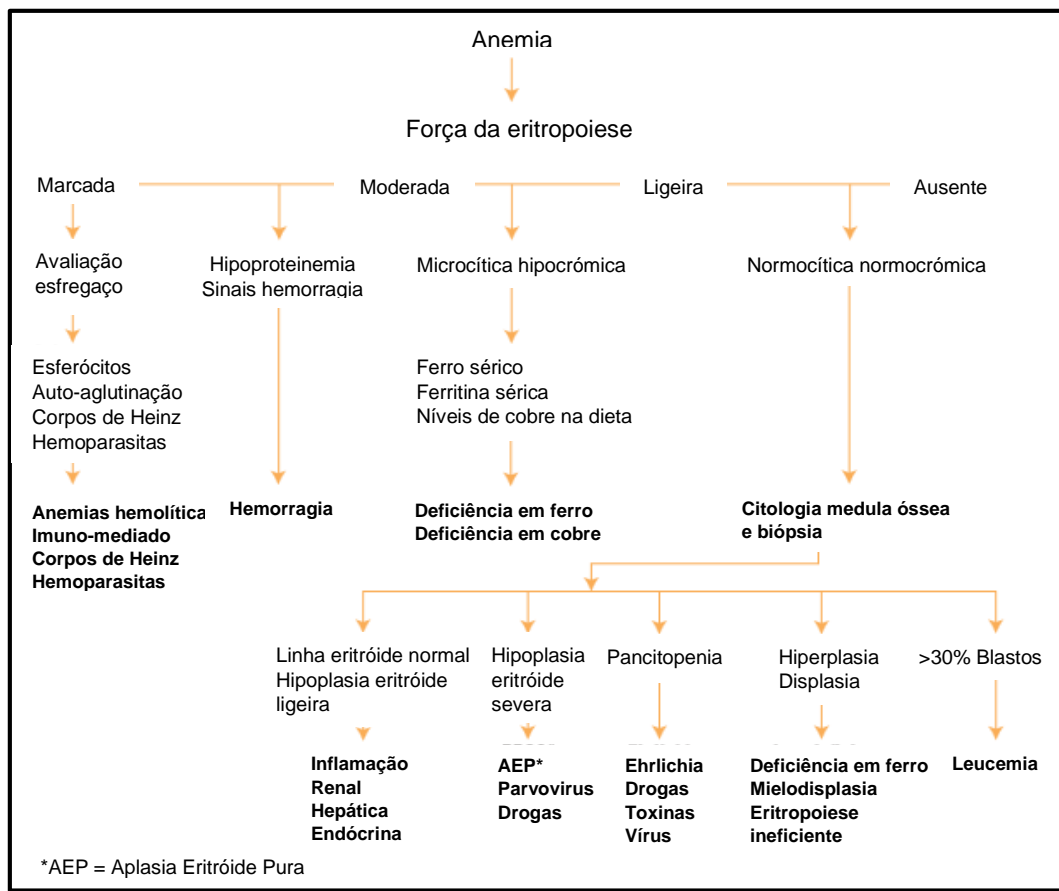


Figura 7 Abordagem à anemia após diagnóstico (adaptado de Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed.)

A gravidade da anemia é estabelecida com base no valor do hematócrito. Tvedten (2010) considera que o primeiro passo após a deteção é estabelecer quão grave a anemia é. Os parâmetro hematócrito, eritrócitos e hemoglobina sofrem oscilações proporcionais de acordo com variações da massa eritróide, pelo que refletem de modo similar a gravidade da anemia. Os valores normais do Hct de cão encontram-se entre 37-55% e os de gato entre 24-45% (Jain, 1986). Estes valores podem demonstrar oscilações com a bibliografia e a tecnologia utilizada. A gravidade da anemia está representada na Tabela 2 e é classificada em ligeira, moderada, grave ou muito grave consoante o intervalo do Hct.

Gravidade da anemia	Hematócrito (%)	
	Cão	Gato
Ligeira	30-37	20-24
Moderada	20-29	14-19
Grave	13-19	10-13
Muito grave	<13	<10

Tabela 2 - Gravidade da anemia (Tasker, 2012)

Após determinar a presença e a gravidade da anemia, deve proceder-se à avaliação da resposta regenerativa (Tvedten, 2010). Isto remete-nos para os diferentes sistemas de classificação da anemia.

3.2.1 Classificação da anemia

3.2.1.1 Regenerativa vs. não regenerativa ou classificação segundo a força da eritropoiese

A classificação mais utilizada para as anemias tem como base a resposta da medula óssea e divide-as em regenerativas e não regenerativas (Neiger et. al., 2002). Anemias não causadas por disfunção medular primária ou secundária mostram elevados sinais de eritropoiese, resultando numa resposta regenerativa. A classificação enquanto regenerativa pressupõe sinais de eritropoiese adequados à severidade e duração da anemia. Anemias regenerativas são causadas por perda de eritrócitos ou destruição de eritrócitos, ou seja, hemorragia e hemólise, respetivamente (Tvedten, 2010).

Anemias não regenerativas podem ter causas medulares ou extra-medulares, como hipoproliferação eritróide, doença inflamatória, insuficiência renal crónica ou hemorragia aguda ou hemólise nas primeiras 48 a 96 horas (Couto, 2009).

O conhecimento da resposta regenerativa de uma anemia é fundamental para compreender causas subjacentes, opções de tratamento e prognóstico (Ramsey & Gould, 1999).

A contagem de reticulócitos é o método de eleição para avaliar a resposta regenerativa na maioria das espécies, uma vez que reticulocitose é o melhor indicador de intensificação da eritropoiese (Laber, Perman & Stevens, 1974; Jain, 1979; Christopher & Harvey, 1992; Riley, Ben-Ezra, Goel, & Tidwell 2001). Reticulócitos são eritrócitos imaturos que contém um retículo de RNA visível que aglomera quando corado com colorações supravitais. Descobertos em 1865 por Erb e denominados reticulócitos em 1891 por Erlich, apenas em 1932 Heilmeyer e Westhaeuser descreveram a sua morfologia e, mais importante, utilidade clínica (Pierre, 2002).

Existem dois tipos de reticulócitos: agregados e pontilhados. Reticulócitos agregados são maiores e mais imaturos e aparecem como policromatófilos no esfregaço corado com colorações do tipo Romanowsky. Reticulócitos pontilhados são mais pequenos e quando sujeitos a estas colorações, aparecem como hemácias normais, pois praticamente não têm resquícios de organelos (Cowgill, Neel & Grindem, 2003). Embora os dois tipos de reticulócitos

possam ser encontrados no sangue de cães e gatos como resposta a anemia, reticulócitos agregados são típicos de cão e pontilhados mais frequentes em gatos. Em gatos apenas se contabilizam os agregados, pois duram menos tempo em circulação, refletindo melhor a resposta medular à anemia (Jain, 1993).

A libertação prematura de reticulócitos ocorre em resposta a elevados níveis de eritropoietina induzidos por hipóxia nos tecidos. A eritropoietina é uma glicoproteína maioritariamente produzida nas células intersticiais do córtex interno e da medular externa do rim em animais adultos. Outros tecidos como o fígado, cérebro e útero produzem também pequenas quantidades, exceto em cães, cuja produção é exclusivamente renal (Reece, 2006; Maiese, Chong & Shang, 2008). A taxa de produção de eritropoietina é inversamente proporcional à capacidade de transporte de oxigénio do sangue (Erslev & Besarab, 1997).

A eritropoiese tem origem em células estaminais hematopoiéticas, as HSC, células multipotentes que se dividem em cópias delas mesmas ou em linhagens sanguíneas específicas. Uma célula multipotente HSC divide-se primeiro num progenitor mieloide comum, CMP, que se diferencia em qualquer célula sanguínea exceto linfócitos. As capacidades de auto-renovação das CMP são limitadas e a sua diferenciação depende de sinais ambientais, que definem se estas se diferenciam num progenitor granulocítico/macrofágico ou num progenitor eritróide-megacariocítico (MEP). Os estímulos ambientais que condicionam a diferenciação de uma CMP num MEP estão associados à expressão de vários fatores de transcrição que regulam genes específicos, recetores de fatores de crescimento e proteínas funcionais, todos estes influenciados, por sua vez, por uma enorme variedade de fatores de crescimento. As MEP diferenciam-se em BFU-E, que por sua vez originam as CFU-E, e estas formam os precursores eritroides na seguinte ordem: rubriblasto, prorrubricito, rubricito, metarrubricito e reticulócito (Akashi, Traver, Miyamoto & Weissman, 2000; Olver 2010).

Após estimulada a sua produção, a EPO vai atuar na medula óssea ao nível das BFU-E e das CFU-E, potenciando a sua diferenciação, e estimulando a divisão dos precursores eritroides nas diversas etapas celulares de desenvolvimento. O seu maior efeito é exercido sobre as CFU-E, que contém o maior número de recetores para a EPO (Riley et. al., 2001; Fisher, 2003). A eritropoietina previne também a apoptose das células progenitoras e dos prorrubricitos, permitindo a sua contínua divisão e maturação. Adicionalmente, estimula a síntese de hemoglobina e a libertação de reticulócitos imaturos na corrente sanguínea (Riley et. al., 2001; Cowgill et. al, 2003).

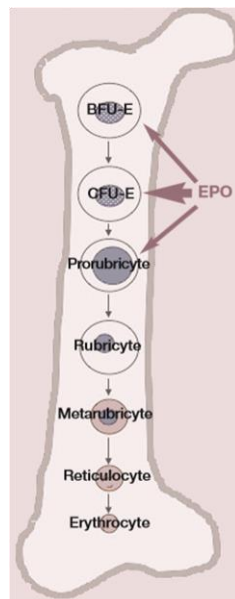


Figura 8 Desenvolvimento dos eritrócitos e ação da EPO (adaptado de Chalhoub et. al, 2011)

Habitualmente não se observa reticulocitose nos primeiros 2 a 4 dias após hemólise ou hemorragia, sugerindo uma anemia aparentemente não regenerativa no sangue periférico. A resposta reticulocitária tem um pico entre o dia 4 e 7 após a causa e começa a diminuir às 2 a 3 semanas em cães e entre os 9 e os 13 dias em gatos, assumindo que o agente causal foi removido (Perkins, Grindem & Cullins, 1995; Fernandez & Grindem, 2006).

A contagem de reticulócitos pode ser feita de modo manual ou automático. A abordagem manual consiste na utilização de uma coloração supravital que faz com que os organelos ainda presentes na célula, juntamente com o RNA, precipitem, formando o retículo, donde surge o nome reticulócito. A coloração recomendada é o novo azul de metileno, que não deve ser confundido com azul de metileno. Existem várias técnicas de preparação das lâminas para contagem de reticulócitos e a escolha do método varia com a preferência do operador. O importante é que a coloração supravital penetre na célula e precipite os seus componentes antes de se proceder à fixação da lâmina (Pierre, 2002).

A visualização da lâmina deve ser feita com objetiva de imersão. O passo seguinte é contar 1000 células vermelhas, sejam eritrócitos maduros ou reticulócitos. Deve-se calcular depois a percentagem de células que correspondem a reticulócitos. A contagem manual compromete a exatidão dos números uma vez que a reticulocitose pode não ser uniforme. De modo a minimizar as probabilidades de erro, podem utilizar-se dispositivos como o retículo de

Miller, que reduzem a probabilidade de enviesar a contagem (Pierre, 2002; Cowgill et. al., 2003; Weiser, 2012b).

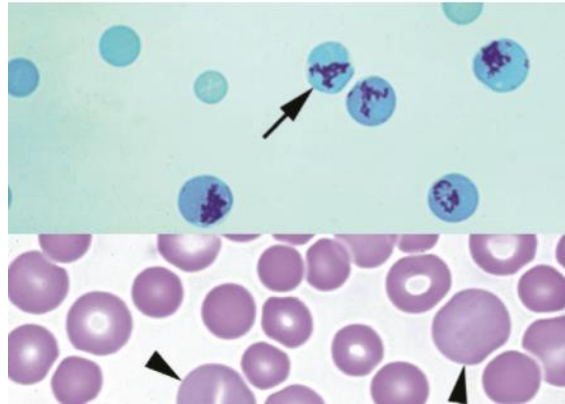


Figura 9 Em cima, reticulócitos de cão corados com novo azul de metileno; em baixo policromatófilos, o equivalente a reticulócitos, corados com Wright-Giemsa (Weiser, 2012b)

A percentagem de reticulócitos pode ser conseguida dividindo o valor obtido na contagem por 10. A percentagem corrigida de reticulócitos, que considera o decréscimo no número de eritrócitos maduros, é obtida através das fórmulas

$$\frac{\% \text{ reticulócitos} \times Hct}{45}$$

$$\frac{\% \text{ reticulócitos} \times Hct}{37}$$

Os valores 45 e 37 expressam uma média do valor do Hct para cães e gato, respetivamente. Tendo em conta que pretendem representar uma média, pode ser encontrada alguma variabilidade nos valores de Hct na literatura ou mesmo consoante a metodologia de trabalho dos vários laboratórios. Para gatos, Fleischman (2012) utiliza o valor 35% e Harvey (2008) 42% (Cowgill et. al., 2003; Fleischman, 2012).

Erros na contagem podem dever-se à metodologia de enumeração, uso inadequado do retículo de Miller, qualidade do esfregaço e variações na distribuição de reticulócitos na lâmina (Riley et. al., 2001; Pierre, 2002). A contagem manual de reticulócitos pode ser feita em pequenas clínicas onde não existam outros recursos, mas leva algum tempo e apresenta a desvantagem de ser subjetiva. Equipamento automático é mais preciso e rápido, sendo, por isso, preferível à contagem manual (Moritz & Tvedten, 2010).

A contagem automática de reticulócitos faz-se com recurso a equipamento que usa como tecnologia citometria de fluxo. Este método reduz a probabilidade de erro pois contabiliza células na ordem das 10.000 unidades. Apresenta outras vantagens, como rapidez, objetividade e menor necessidade de recurso a mão-de-obra. Um contra associado a este tipo de equipamentos é a contagem falsamente elevada caso a máquina assuma algumas inclusões como componentes dos reticulócitos, como por exemplo corpos de Howell-Jolly ou parasitas, acabando por incluir essas células na contagem. Há ainda que considerar o preço deste tipo de equipamentos. Algumas máquinas utilizadas para a realização de hemogramas na prática clínica incluem também contagem de reticulócitos (Cowgill et. al., 2003).

A contagem absoluta de reticulócitos reflete a quantidade de reticulócitos por μL de sangue. Este parâmetro é mais preciso como indicador da atividade medular que a percentagem de reticulócitos, pois tem em consideração o decréscimo na população de eritrócitos, prevenindo assim a ideia errada de um aumento dos reticulócitos dada pela percentagem (Cowell, 2007). O cálculo é feito através da multiplicação da percentagem de reticulócitos em casas decimais pela contagem de eritrócitos.

A tabela 3 representa o limiar a partir do qual se considera existir eritropoiese ativa para a percentagem de reticulócitos e para a contagem absoluta de reticulócitos. Estes valores podem apresentar algumas oscilações com a bibliografia.

Grau de regeneração	% Reticulócitos		Reticulócitos/ μL	
	Cão	Gato	Cão	Gato (agreg.)
Ausente	-	-	<60.000	15.000
Ligeiro	1-4	0.5-2	60.000-150.000	15.000-50.000
Moderado	5-20	3-4	150.000-300.000	50.000-100.000
Marcado	>20	>4	>500.000	>200.000

Tabela 3 - Guidelines para avaliação da resposta reticulocitária (Fleischman, 2012)

Outros indícios de resposta regenerativa foram já enumerados no tópico esfregaço sanguíneo e incluem policromasia, anisocitose, corpos de Howell-Jolly e *basophilic stippling*.

3.2.1.1.1 Anemias regenerativas

Após classificar uma anemia como regenerativa, deve averiguar-se se a causa é hemólise ou hemorragia (Fleischman, 2012). Embora não seja um método 100% fiável, a

medição das proteínas totais (PT) auxilia na diferenciação entre as duas. Em episódios de hemorragia as PT encontram-se geralmente diminuídas devido à perda que ocorre juntamente com os eritrócitos. Como em caso de hemólise não há perda destas proteínas, os valores encontram-se normais ou aumentados pela presença de inflamação associada à hemólise. Deve proceder-se, no entanto, com alguma cautela ao utilizar as PT como critério para diferenciar hemólise de hemorragia; em casos de hemorragia interna o parâmetro pode apresentar valores normais por ocorrer a sua reabsorção (Cowell, 2007).

A hemorragia externa é usualmente fácil de diagnosticar, a menos que a perda seja do trato gastrointestinal. Perda de sangue dentro de uma cavidade pode apresentar um desafio ao diagnóstico. Anemia ferropriva é, em animais adultos, quase sempre devida a perda de sangue crónica, sendo a hemorragia gastrointestinal a causa mais comum de perda crónica (Thrall, 2012d).

As hemorragias agudas geralmente não causam alterações na morfologia eritrocitária, à exceção de hemorragia associada a hemangiosarcoma.

As anemias hemolíticas são, regra geral, as que induzem maior resposta regenerativa (Tvedten, 2010). A lise pode ter origem dentro dos vasos, hemólise intravascular, ou fora da vasculatura, hemólise extravascular. Na maior parte dos casos a hemólise ocorre intra e extravascular, com uma das localizações a predominar (Cowell, 2007).

Anemia hemolítica imuno-mediada é a causa mais comum de hemólise em cães (Thrall, 2012d) e é pouco frequente em gatos (Stokol, 2010). Pode ser classificada como primária/idiopática ou secundária a agentes infecciosos, fármacos ou tumores (Werner & Gorman, 1984; Reimer, Troy & Warnick, 1999).

Uma situação excecional em que a AHIM não se expressa como regenerativa ocorre quando o alvo do sistema imunitário não é apenas o eritrócito maduro mas também os precursores. Nesse caso a resposta medular é não regenerativa e a avaliação da medula torna-se essencial para chegar ao diagnóstico (Day, 2010).

Outras causas de hemólise incluem hemoparasitas, tóxicos, vasculopatias, algumas condições hereditárias e deficiências enzimáticas (Cowell, 2007).

As causas de anemia regenerativa encontram-se ilustradas nas Tabelas 4 e 5 e estão divididas em hemólise e hemorragia, respetivamente.

Anemias regenerativas	
Causas de hemólise	
Imuno-mediada	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Auto-imune <ul style="list-style-type: none"> - Primária/idiopática - Isoeritrólise neonatal - Transfusões sanguíneas ✓ Secundária <ul style="list-style-type: none"> - Infecção - Neoplasia - Efeitos de fármacos - Reação vacinal adversa
Infeciosa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Micoplasmose ✓ Erliquiose ✓ Babesiose ✓ Cytauxzoonose ✓ FeLV ✓ Septicemia
Danos físicos à membrana dos RBC	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Trauma mecânico (CID, Síndrome da veia cava cranial, glomerulonefrite, Síndrome hemolítico-urémico) ✓ Alterações endoteliais (hemangiossarcoma, vasculite, torção esplénica, doença hepática) ✓ Alterações térmicas (golpe de calor, queimaduras severas)
Fármacos e toxinas/dano químico aos RBC	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Intoxicação por zinco ✓ Envenenamento (cobras) ✓ Hipofosfatemia severa ✓ Ingestão de oxidantes (cebola, alho, paracetamol, propilenoglicol)
Síndrome hemofagocítico	
Anomalias congénitas dos RBC	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Defeitos na síntese do grupo heme (raro) ✓ Defeitos da membrana (estomatocitose, ↑ da fragilidade osmótica) ✓ Defeitos enzimáticos (deficiência em piruvato-quinase, deficiência em fosfofrutoquinase)

Tabela 4 Causas de hemólise (adaptado de Fleischman, 2012)

Anemias regenerativas
Causas de hemorragia
Interna ou externa <ul style="list-style-type: none">✓ Desordens da coagulação – CID, toxicidade por rodenticidas, deficiência em fatores, trombocitopenia, Doença de von Willebrand✓ Trauma✓ Cirurgia
Interna <ul style="list-style-type: none">✓ Rutura esplénica (hematoma, neoplasia, trauma)✓ Hemorragia não esplénica
Externa <ul style="list-style-type: none">✓ Perdas GI (neoplasia, úlceras, pólipos, IBD, parasitas), respiratórias, urogenitais✓ Ectoparasitas – pulgas, carraças

Tabela 5 Causas de hemorragia (adaptado de Fleischman, 2012)

3.2.1.1.2 Anemias não regenerativas

Como já abordado, a ausência de eritrócitos imaturos circulantes é indicadora de anemia não regenerativa, e fornece indícios de disfunção da medula óssea. A maioria das anemias não regenerativas é normocrômica.

As anemias não regenerativas são sujeitas a uma subclassificação com base nas outras linhas celulares. A ausência de regeneração pode cingir-se à linha eritróide ou acometer a linha branca e plaquetas.

As alterações reversíveis das células estaminais usualmente manifestam-se através de neutropenia, devido à curta semi-vida dos neutrófilos no sangue. A neutropenia pode fazer-se acompanhar por trombocitopenia e anemia não regenerativa caso a causa não seja removida num período de 1 a 2 semanas. Vírus, fármacos ou químicos podem causar alterações temporárias e são exemplo o albendazol, o metimazol e os estrogénios.

Desordens irreversíveis, diferentemente das anteriores, resultam de defeito intrínseco no comportamento proliferativo ou regulador da diferenciação em células hematopoiéticas. Estas desordens raramente resolvem espontaneamente e intervenção terapêutica quase nunca corrige a anomalia proliferativa. As manifestações são variáveis e vão de aplasia a produção desmedida e incontrolada, a neoplasia proliferativa.

Animais com anemia não regenerativa cujos leucócitos e plaquetas não demonstram alterações podem ter um defeito medular intrínseco ou apresentar uma desordem extrínseca à medula mas que diminui ou deforma a eritropoiese.

A etiologia inclui insuficiência renal crónica, anemia associada a doença inflamatória, endocrinopatias e, menos frequentemente, deficiências nutricionais (Thrall, 2012c). A causa mais comum de anemia não regenerativa em cães e gatos é anemia associada a doença inflamatória, anteriormente denominada anemia associada a doença crónica (Fleischman, 2012).

As causas de anemia não regenerativa estão sintetizadas na Tabela 6.

Anemia não regenerativa
Hemorragia ou hemólise recente
Hipoplasia eritróide
<ul style="list-style-type: none">✓ Deficiência de EPO – insuficiência renal crónica✓ Resposta medular à EPO diminuída<ul style="list-style-type: none">- Hipotireoidismo- Hipoadrenocorticism- Hipopituitarismo✓ Ferro disponível insuficiente<ul style="list-style-type: none">- Sequestro pelos fagócitos mononucleares – anemia da doença inflamatória (inflamação, infeção, neoplasia)- Diminuição/perda de sangue – hemorragia externa crónica (GI, respiratória, urinária)- Metabolismo hepático alterado – shunt porto-sistémico✓ Patologia medular<ul style="list-style-type: none">- Mieloptise (neoplasia, fibrose)- Mielofibrose (sequela de AHIM, deficiência em piruvato-quinase, secundária a fármacos, necrose, neoplasia)- Mielonecrose (secundária a fármacos, neoplasia, sepsis, hipoxia, infeção, radiação, doença imunomediada)- Mielodisplasia (primária ou secundária)- Anemia aplástica (infeção, secundária a fármacos, estrogénios, toxinas, radiação, idiopática)- Aplasia eritróide pura/eritropoiese ineficiente IM- Síndrome hemofagocítico (primário ou secundário)- Eritroleucemia- Reação adversa a fármacos ou a toxinas

- Infecioso (parvovirus, *Ehrlichia* spp, FIV, FeLV, sepsis)

Defeitos na maturação

- ✓ Deficiências nutricionais – vitamina B12, folatos, piridoxina, cobre
- ✓ FeLV
- ✓ Diseritropoiese hereditária

Tabela 6 Causas de anemia não regenerativa (adaptado de Fleischman, 2012)

3.2.1.2 Classificação morfológica ou segundo o volume eritrocitário e a concentração de hemoglobina

As anemias podem ser classificadas com base na morfologia eritrocitária através dos índices eritrocitários MCV e MCHC (Jain, 1993). Este sistema de classificação constitui uma abordagem tradicional à anemia e pode fornecer pistas importantes ao diagnóstico (Tvedten, 1999). Classifica os eritrócitos em microcíticos, normocíticos ou macrocíticos, consoante as suas dimensões, e em hipocrómicos ou normocrómicos, consoante o seu teor em hemoglobina (Tvedten, 2010).

Os três padrões de diagnóstico que assumem relevância nesta classificação são: anemia macrocítica hipocrómica, anemia normocítica normocrómica e anemia microcítica hipocrómica. Anemia macrocítica hipocrómica é caracterizada por eritrócitos grandes e pouco hemoglobinizados, ou seja, células imaturas. Esta classificação é típica de anemias regenerativas. Já a anemia normocítica normocrómica é caracterizada por hemácias de tamanho e teor de hemoglobina normais, sendo por isso classificada como não regenerativa. A categoria microcítica hipocrómica está associada a anemia ferropriva, em que os eritrócitos são mais pequenos e de coloração menos acentuada devido à falta de ferro (Tvedten, 2010).

Os índices MCV e MCHC têm sido amplamente utilizados para proceder a esta classificação. No entanto, em 1999 Tvedten sugeriu que a classificação através destes parâmetros poderia trazer alguns problemas. De facto, o autor afirma na sua publicação *Morphologic Classification of Anemia* que o MCV e o MCHC são insensíveis, no sentido em que é necessário um grande número de células hipocrómicas e macro ou microcíticas para que estes parâmetros caiam fora dos intervalos de referência. Alterações ligeiras ou precoces não são detetadas por estes índices.

Quando comparado com o MCV e com a anisocitose no esfregaço, o índice de anisocitose RDW mostrou ser mais sensível na deteção de alterações nas subpopulações de eritrócitos (Neiger et. al., 2002). Este parâmetro sofre alterações perante variações no tamanho

das células antes do MCV (Thrall, 2012). Embora Hodges & Christopher (2011) aleguem que a pesquisa de policromatófilos no esfregaço é mais sensível que os índices eritrocitários para a deteção de hemácias macrocíticas e hipocrômicas, relativamente ao tamanho Thrall (2012) refere que o MCV é preferível à avaliação qualitativa do esfregaço, pois as células têm que ser muito pequenas para que, visualmente, a diminuição no seu diâmetro seja detetada na microscopia. Neiger et. al. (2002) listam, adicionalmente, as variações nos intervalos de referência das diferentes tecnologias utilizadas para as medições dos índices como um fator impeditivo para chegar a um consenso sobre estes parâmetros.

Por outro lado, a policromasia no esfregaço sanguíneo mostrou ser um indicador mais preciso para indicar regeneração do que os índices eritrocitários em cães. No estudo em questão, apenas um em dez cães com anemia regenerativa apresentava anemia macrocítica hipocrômica. Os autores concluíram também que o RDW tem maior sensibilidade diagnóstica para identificar resposta regenerativa quando comparado com o MCV e o MCHC, embora tenha apresentado baixa especificidade. A policromasia, juntamente com o RDW, foi o método de eleição, pelo que os autores indicam que o grau de regeneração medular deve ser avaliado através da realização de esfregaço sanguíneo quando a contagem de reticulócitos não se encontra disponível (Hodges & Christopher, 2011). Esta informação vem de encontro ao que Jain sugere em 1993, que a classificação morfológica deve ser sempre confirmada com a avaliação microscópica das populações eritróides.

Uma publicação de 2014 sobre anemia em gatos (Furman et. al., 2014) teve como um dos objetivos a classificação das amostras com base no MCV e MCHC para posteriormente avaliar a utilidade diagnóstica destes índices. Os resultados mostraram que a morfologia eritrocitária baseada nos índices não pode ser utilizada no sentido de avaliar o grau de regeneração; verificou-se uma discrepância considerável no grau de regeneração obtido através dos índices eritrocitários comparativamente com a contagem de reticulócitos.

3.2.1.3 Classificação pelos achados do esfregaço sanguíneo

Como abordado no ponto 3.2.3, a avaliação do esfregaço sanguíneo é um procedimento essencial para a classificação da anemia, especialmente em casos de anemias hemolíticas. Muitas observações críticas para chegar a um diagnóstico só podem ser feitas por um técnico experiente no âmbito da microscopia. Alguns destes exemplos incluem, entre outros,

esferocitose, hemoparasitas, auto-aglutinação, corpos de Heinz, hipocromasia e fragmentação eritrocitária (Tvedten, 2010).

3.2.1.4 Classificação segundo a etiologia

Uma vez compreendido o estado regenerativo da anemia, é importante eliminar as várias causas de anemias regenerativas ou não regenerativas e chegar a uma etiologia correta (Fleischman, 2012). O percurso clínico até identificação da causa varia de caso para caso e, por vezes, a etiologia pode ser identificada na história clínica e anamnese, pelo que a abordagem ao proprietário constitui uma etapa importante (Tvedten, 2010).

As causas de anemia encontram-se listadas nas Tabelas 4, 5 e 6 e encontram-se divididas mediante a resposta regenerativa.

Num estudo realizado no Reino Unido, *A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data*, alterações da medula óssea constituíram a principal causa de anemia (52,8%), seguidas por hemorragia (20,6%) e hemólise (10,6%). Dentro da classificação DAMNITV, do inglês *degenerative, anomalous, metabolic, miscellaneous, neoplastic, infectious, inflammatory, immune-mediated, toxic, traumatic or vascular disease process*, doença infecciosa foi a principal causa de anemia, correspondendo a 21,7% da amostra. Os autores referem que existem poucos estudos que classifiquem a etiologia das anemias em gatos (Korman et. al., 2012).

Num total de 456 cães, Chervier et. al. (2012) obtiveram anemia associada a tumores como a maior causa, seguida de anemia associada a doença inflamatória. Este estudo excluiu hemorragia aguda das etiologias.

4. Materiais e métodos

4.1 Caracterização da amostra

Os elementos constituintes da amostra deste estudo são cães e gatos que se apresentaram à consulta ou permaneceram internados no Hospital Veterinário do Porto.

Os dados foram recolhidos durante o período de realização do estágio curricular e compreenderam análises sanguíneas obtidas entre Novembro de 2009 e Maio de 2015. A pesquisa resultou num total de 81 animais, dos quais 22 foram excluídos por não cumprirem os critérios de inclusão. A amostra final conta com 59 animais, que foram posteriormente divididos em dois grupos: cães, com 33 hemogramas, e gatos, com 26.

A amostra seguiu os seguintes critérios de inclusão:

- cães ou gatos anémicos (canídeos $Hct < 39\%$ ou $RBC < 5.5 \times 10^{12}/L$; felídeos $Hct < 28\%$ ou $RBC < 4.6 \times 10^{12}/L$) que tenham realizado hemograma no HVP;
- contagem de reticulócitos requisitada ao Laboratório de Referência INNO, na sequência do hemograma;
- hemograma e contagem de reticulócitos realizados a partir da mesma amostra de sangue ou a partir de amostras diferentes cuja colheita não tenha diferido mais do que um dia.

Os critérios de exclusão foram:

- contagem de reticulócitos requisitada com mais do que um dia de diferença do hemograma;
- dados analíticos incompletos (exemplo: falta de um parâmetro do hemograma)

Em animais com mais de um conjunto hemograma e contagem de reticulócitos disponível, foi considerado apenas o primeiro.

4.2 Colheita de sangue e equipamento hematológico

A colheita de sangue para a realização dos hemogramas e contagens de reticulócitos foi feita por venopunção da veia jugular após assepsia rigorosa. O sangue foi colocado em tubos contendo EDTA.

Para a realização dos hemogramas, utilizou-se a máquina BC-2800Vet da marca Mindray, que funciona com base no método impedância elétrica. Os intervalos de referência que este equipamento apresenta para os vários parâmetros hematológicos da série eritróide encontram-se listados na Tabela 7.

	Cão	Gato
Eritrócitos ($\times 10^{12}/L$)	5.50-8.50	4.60-10.0
Hemoglobina (g/L)	110-190	93-153
Hematócrito (%)	39.0-56.0	28.0-49.0
MCV (fL)	62.0-72.0	39.0-52.0
MCH (pg)	20.0-25.0	13.0-21.0
MCHC (g/L)	300-380	300-380
RDW (%)	11.0-15.5	14.0-18.0

Tabela 7 Valores de referência do equipamento BC-2800Vet – série eritróide

O sangue que teve como finalidade a contagem total de reticulócitos conservou-se refrigerado a uma temperatura de 4°C até se proceder à sua recolha. As amostras tiveram como destino o Laboratório de Referência INNO, situado em Braga, e o seu transporte foi realizado no dia da colheita. A contagem automática fez-se com recurso ao equipamento de citometria de fluxo Sysmex XT-2000iV. O carácter regenerativo da anemia foi classificado com base na contagem total de reticulócitos. Os intervalos utilizados para a classificação da resposta regenerativa da anemia encontram-se na Tabela 8.

Grau de regeneração	% Reticulócitos		Reticulócitos/μL	
	Cão	Gato	Cão	Gato (agreg.)
Ausente	-	-	<60.000	15.000
Ligeiro	1-4	0.5-2	60.000-150.000	15.000-50.000
Moderado	5-20	3-4	150.000-300.000	50.000-100.000
Marcado	>20	>4	>500.000	>200.000

Tabela 8 Grau de regeneração da resposta regenerativa com base na percentagem e contagem total de reticulócitos – equipamento Sysmex XT-2000iV

Cães com um total de reticulócitos compreendido entre 300.000/ μL e 500.000/ μL e gatos com valores entre 100.000 e 200.000/ μL foram classificados com resposta regenerativa moderada.

4.3 Análise estatística

Para o tratamento dos dados foram utilizados os programas SPSS® versão 22 e Microsoft Excel® versão 2013.

A distribuição dos dados foi verificada com recurso ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As correlações entre variáveis de distribuição normal foram feitas através do coeficiente

de correlação paramétrica de Pearson e as entre variáveis de distribuição não normal através do coeficiente de correlação não-paramétrica de Spearman.

Foram ainda utilizados os testes ANOVA e Kruskal-Wallis, para dados paramétricos e não-paramétricos, respetivamente.

A prevalência de anemias regenerativas e anemias não regenerativas foi calculada de acordo com a expressão (reportada em valores percentuais):

$$\text{Prevalência} = \frac{n^{\circ} \text{ de casos}}{\text{população em estudo}} \times 100$$

Procedeu-se adicionalmente a outra classificação que dividiu os elementos da amostra segundo a etiologia da anemia. A classificação escolhida foi adaptada de *A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data* de Korman et. al. (2012) e dividiu a etiologia em hemorragia, hemólise ou alterações da medula óssea. Nesta última categoria, foi feita uma subdivisão em doença primária ou supressão secundária. A supressão secundária foi, por sua vez, dividida em neoplasia, doença renal, infecciosa/inflamatória, várias ou endocrinopatias, tópico acrescentado à classificação original. Acrescentou-se ainda o tópico causa desconhecida.

Em função da diversidade de categorias relativas à etiologia, optou-se por classificar as duas populações em conjunto. Hemoparasitas foram incluídos na classificação hemólise.

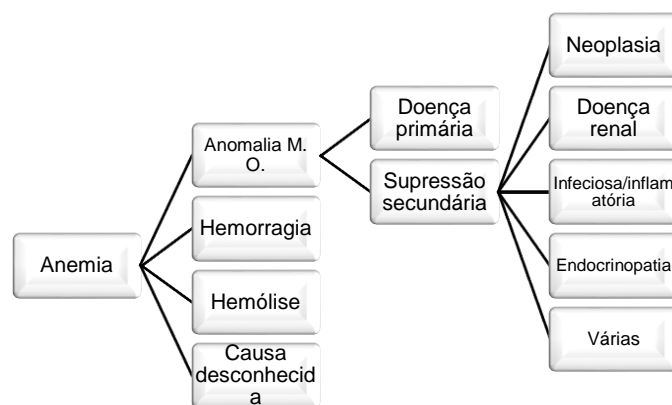


Figura 10 Diagrama utilizado para a classificação das anemias

5. Resultados

A Tabela 9 representa a estatística descritiva das variáveis do eritrograma e dos reticulócitos de cão. Os gráficos no seguimento representam a distribuição dos parâmetros MCV, MCHC, RDW e Total de Reticulócitos.

Variável	Média	Intervalo de Confiança de 95% para a Média		Mínimo	Máximo
		Limite inferior	Limite superior		
Eritrócitos ($\times 10^{12}/L$)	3,73	3,40	4,06	1,77	5,75
Hemoglobina (g/dL)	84,90	77,25	92,56	45,0	141,0
Hematócrito (%)	25,05	23,08	27,02	12,7	37,1
MCV (fL)	68,46	66,15	70,77	58,7	91,5
MCH (pg)	23,02	22,26	23,79	17,2	26,2
MCHC (g/L)	339,12	331,09	347,14	284,0	380,0
RDW (%)	14,10	13,19	15,02	10,0	19,7
Total Reticulócitos ($\times 10^4/\mu L$)	8,88	5,65	12,11	0,63	42,30
Reticulócitos (%)	2,52	1,56	3,48	0,21	12,75

Tabela 9 Estatística descritiva das variáveis do grupo Cães

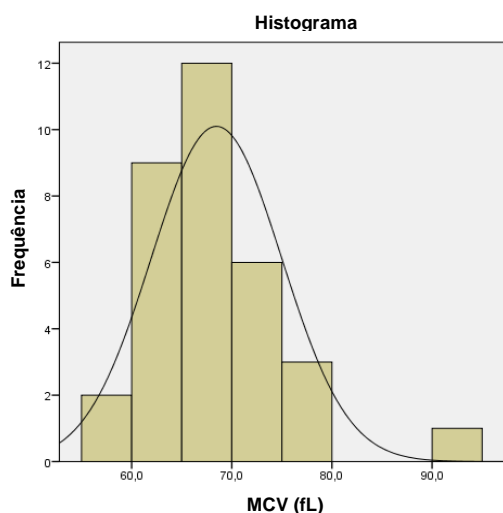


Figura 11 Distribuição da variável MCV, Cães

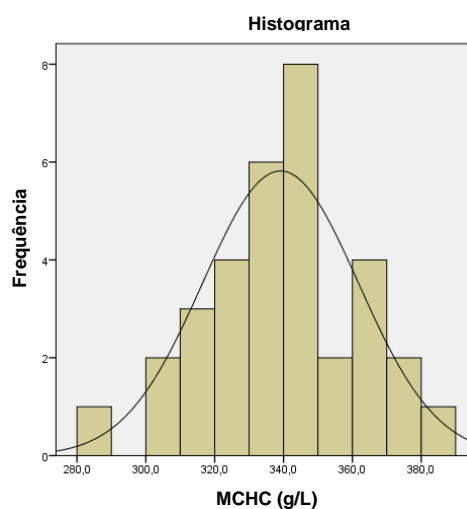


Figura 12 Distribuição da variável MCHC, Cães

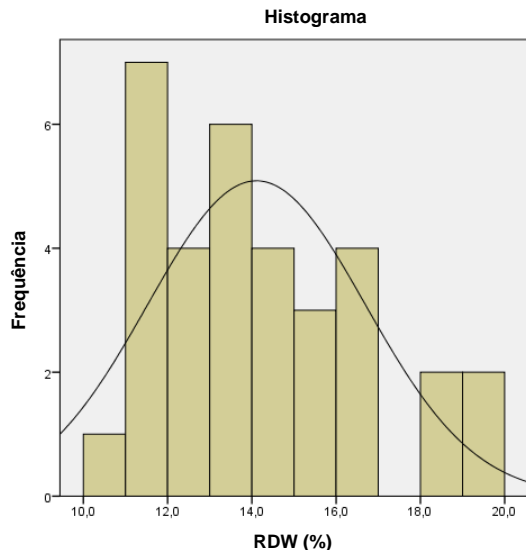


Figura 13 Distribuição da variável RDW, Cães

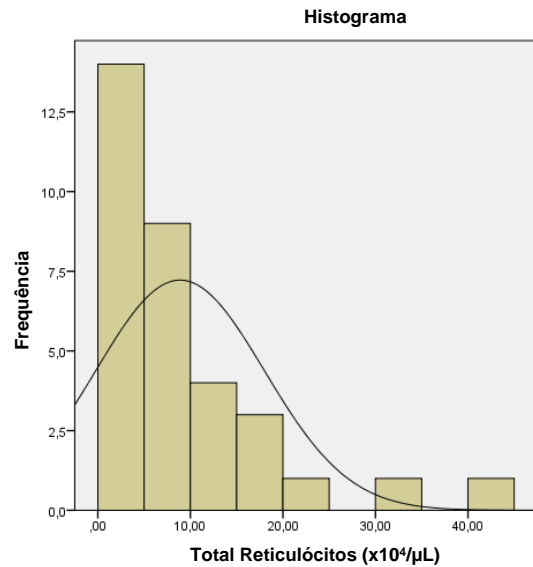


Figura 14 Distribuição da variável Total de Reticulócitos, Cães

Na amostra constituída por canídeos, as variáveis MCV, MCHC e RDW assumiram uma distribuição normal, conforme se pode constatar nas Figuras 11, 12 e 13. A variável Total de Reticulócitos não apresentou distribuição normal (Figura 14).

Não sendo alvo de interesse para os objetivos deste trabalho, é, no entanto, pertinente apontar as correlações entre as variáveis Eritrócitos, Hemoglobina e Hematócrito, uma vez que reforçam a validação da qualidade dos dados recolhidos. Assim, e como seria expectável, as correlações entre as ditas variáveis são estatisticamente significativas e muito fortes. Os resultados obtidos foram os seguintes: Eritrócitos e Hemoglobina com $r = 0,907$, $n = 33$ e $p = 0,000$; Eritrócitos e Hematócrito com $r = 0,936$, $n = 33$ e $p = 0,000$; Hemoglobina e Hematócrito com $r = 0,963$, $n = 33$ e $p = 0,000$.

A variável Total de Reticulócitos não apresentou correlações significativas com as variáveis MCV, MCHC e RDW. Foram obtidas as seguintes correlações: Total de Reticulócitos e MCV com $r = -0,049$, $n = 33$ e $p = 0,394$; Total de Reticulócitos e MCHC com $r = -0,117$, $n = 33$ e $p = 0,259$; Total de Reticulócitos e RDW com $r = 0,206$, $n = 33$ e $p = 0,125$.

Foi realizada adicionalmente uma análise ANOVA para verificar a existência de diferenças entre as médias dos grupos nos quais se dividiu a resposta regenerativa (ausente, ligeira, moderada ou marcada). A análise não resultou em diferenças significativas entre a média dos grupos de classificação da resposta regenerativa para as variáveis MCV, MCHC e RDW. Para a análise do Total de Reticulócitos, procedeu-se à análise Kruskal-Wallis, que demonstrou diferenças significativas entre as médias destes mesmos grupos.

Considerando o valor 60.000 reticulócitos/ μ L como o limiar para definir anemia como regenerativa ou não regenerativa, do total de 33 canídeos 49,5% não apresentaram resposta regenerativa e 51,5% apresentaram resposta regenerativa, correspondendo a 16 e 17 elementos, respetivamente. Dos 17 elementos com anemia regenerativa, 12 (71%) mostraram resposta regenerativa ligeira e 5 (29%) resposta regenerativa moderada. Não foram encontrados sinais de resposta regenerativa marcada.

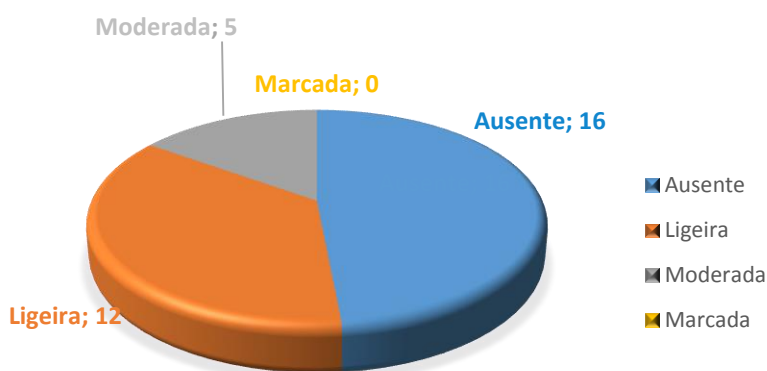


Figura 15 Resposta regenerativa da população cães

A Tabela 10 representa a estatística descritiva das variáveis do eritrograma e dos reticulócitos de gato. Os gráficos na sequência representam a distribuição dos parâmetros MCV, MCHC, RDW e Total de Reticulócitos.

Variável	Média	Intervalo de Confiança de 95% para a Média		Mínimo	Máximo
		Limite inferior	Limite superior		
Eritrócitos ($\times 10^{12}/L$)	3,70	3,30	4,10	1,76	5,72
Hemoglobina (g/dL)	60,84	54,66	67,01	33,0	90,0
Hematócrito (%)	18,04	16,06	20,01	9,2	28,0
MCV (fL)	49,64	46,87	52,41	37,0	59,1
MCH (pg)	16,58	15,71	17,45	12,8	21,1
MCHC (g/L)	337,04	326,17	347,90	286,0	380,0
RDW (%)	16,42	15,63	17,21	14,1	20,5

Total	4,68	2,99	6,38	0,51	16,70
Reticulócitos ($\times 10^4/\mu\text{L}$)					
Reticulócitos agregados (%)	1,27	0,76	1,77	0,17	5,78

Tabela 10 Estatística descritiva das variáveis do grupo Gatos

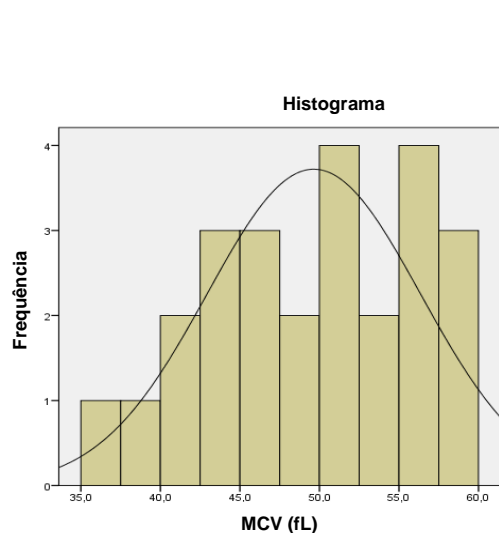


Figura 16 Distribuição da variável MCV, Gatos

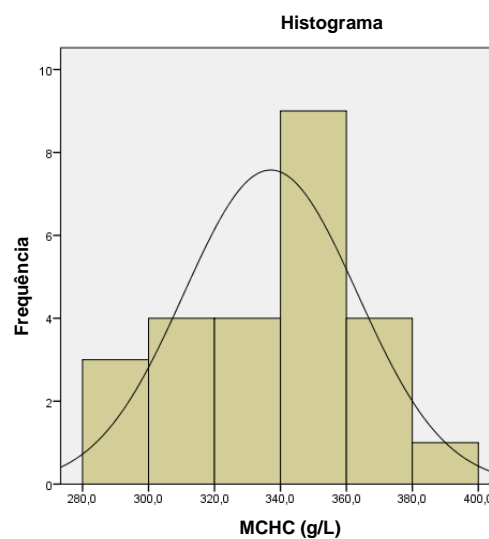


Figura 17 Distribuição da variável MCHC, Gatos

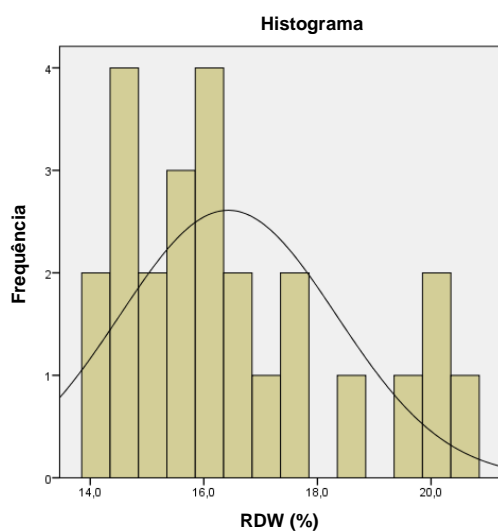


Figura 18 Distribuição da variável RDW, Gatos

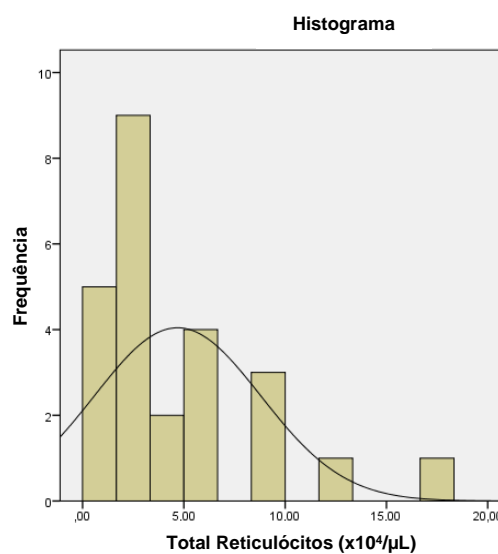


Figura 19 Distribuição da variável Total de Reticulócitos, Gatos

Na amostra felina, como se pode verificar nas Figuras 18 e 19, as variáveis RDW e Total de Reticulócitos não assumem uma distribuição normal. Os índices MCV e MCHC assumem distribuição normal (Figuras 16 e 17).

Mais uma vez, e sempre no sentido de validação da amostra, obtiveram-se as seguintes correlações para as variáveis Eritrócitos, Hematócrito e Hemoglobina: Eritrócitos e Hemoglobina com $r = 0,880$, $n = 26$ e $p = 0,000$; Eritrócitos e Hematócrito com $r = 0,868$, $n = 26$ e $p = 0,000$; Hemoglobina e Hematócrito com $r = 0,958$, $n = 26$ e $p = 0,000$.

Não foram encontradas correlações significativas entre o Total de Reticulócitos e as variáveis MCV, MCHC e RDW. Foram obtidos os seguintes resultados: Total de Reticulócitos e MCV com $r = -0,003$, $n = 26$ e $p = 0,435$; Total de Reticulócitos e MCHC com $r = 0,012$, $n = 26$ e $p = 0,476$; Total de Reticulócitos e RDW com $r = 0,046$, $n = 26$ e $p = 0,411$.

Na análise ANOVA, não se verificaram diferenças significativas na média dos grupos para as variáveis MCV e o MCHC.

Para a análise do RDW e Total de Reticulócitos, utilizou-se a análise Kruskal-Wallis. Relativamente à variável RDW, não se verificaram diferenças significativas entre as médias dos grupos de resposta regenerativa. Para a variável Total de Reticulócitos, foram encontradas diferenças significativas entre as médias destes grupos.

Tendo como referência o valor 15.000 reticulócitos/ μL para estabelecer regeneração, a amostra de felídeos anêmicos contou com 5 elementos (19%) com anemia não regenerativa e 21 (81%) com anemia regenerativa. A resposta regenerativa foi ligeira em 57% dos casos de regeneração, correspondendo a 12 animais, e moderada em 43% dos casos, correspondendo a 9. Tal como na amostra de cães, não houve animais com resposta regenerativa marcada.

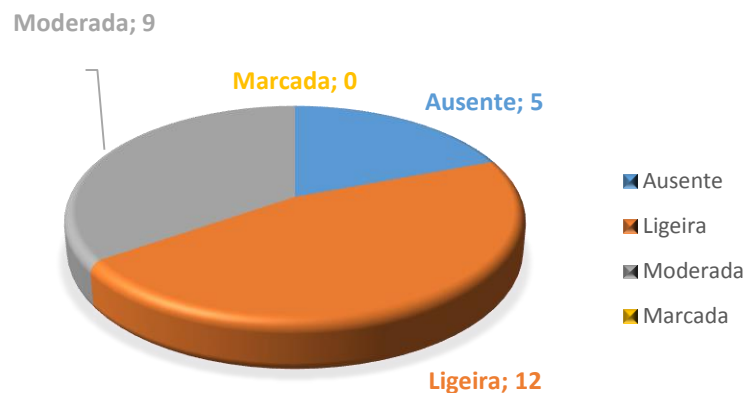


Figura 20 Resposta regenerativa da população gatos

A classificação das anemias em função da etiologia foi efetuada contemplando juntamente as amostras canina e felina.

Anomalias da medula óssea constituíram a maior causa de anemia, com um total de 34 animais. A anemia destes animais teve origem em supressão medular secundária, não se verificando na amostra alterações medulares primárias. A supressão medular foi secundária a patologia inflamatória ou infecciosa em 12 animais, várias origens em 9, insuficiência renal crónica em 8, neoplasia em 3 e endocrinopatias em 2.

No grupo anemia de várias origens verificaram-se casos de doença periodontal, patologia articular, hipotireoidismo, cardiopatia, hemoparasitas, colangiohepatite, FIV, doença renal crónica e pancreatite.

O grupo etiologia infecciosa/inflamatória incluiu casos de leptospirose, hepatite infecciosa, esgana, gastroenterite viral, FIV, gastroenterite de origem desconhecida, patologia hepática não infecciosa e fraturas.

Os restantes 25 animais obtiveram os resultados etiologia desconhecida (17 animais), hemólise (6) e hemorragia (2).

A figura que se segue contempla as etiologias e respetivas percentagens.

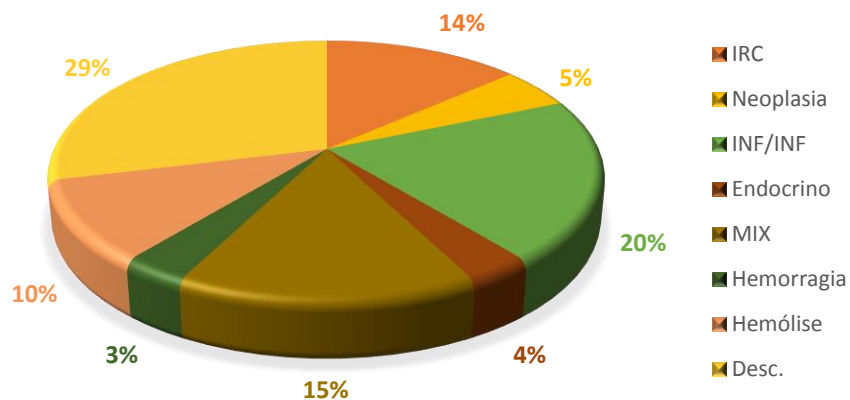


Figura 21 Etiologias da anemia

6. Discussão

A contagem total de reticulócitos foi utilizada para a classificação do carácter regenerativo da anemia. Este parâmetro foi escolhido ao invés da percentagem de reticulócitos por ser um indicador mais preciso da atividade regenerativa da medula óssea, uma vez que tem em conta o grau de anemia (Cowell, 2007).

O índice eritrocitário MCH foi dispensado da análise de dados por não ser muito utilizado em Medicina Veterinária (Voigt, 2000; Weiser, 2012b).

A amostra utilizada neste estudo contou com 59 animais anémicos e respetivas análises sanguíneas, 33 pertencentes a canídeos e 26 a felídeos. Procedeu-se à subdivisão da amostra nestes dois grupos devido às diferenças dos parâmetros e respetivos intervalos de referência verificadas nas duas espécies. Esta divisão, inevitavelmente, repartiu a população inicial em duas populações consideravelmente menores e, consequentemente, menos representativas das populações de cães e gatos.

Não foram detetadas correlações significativas entre a variável Total de Reticulócitos e as variáveis MCV, MCHC e RDW. Adicionalmente, procedeu-se a análises ANOVA e Kruskal-Wallis, no sentido de verificar se existiriam diferenças entre as médias das variáveis MCV, MCHC e RDW nos grupos de classificação consoante o total de reticulócitos. Esta análise não detetou diferença entre as médias destes três parâmetros, o que é compatível com a inexistência de correlação entre o Total de Reticulócitos e os índices eritrocitários.

As diferenças detetadas entre as médias da variável Total de Reticulócitos nos diferentes grupos de classificação da resposta regenerativa eram expectáveis, uma vez que os grupos foram formados tendo em conta o Total de Reticulócitos.

Analizando os dados obtidos no grupo cães, com especial enfoque nos 5 elementos com contagem de reticulócitos mais elevada e, consequentemente, maior resposta regenerativa, apenas um apresentou aumento do MCV (77,5 fL para um intervalo de referência de 62-72 fL) e dois apresentaram aumento do RDW, um deles com um valor imediatamente a seguir ao limite superior (16,7% e 15,6% face a um intervalo de referência de 11-15,5%). Um dos 5 elementos apresentou um valor de MCV abaixo do intervalo de referência (58,9 fL). O índice MCHC, nestes 5 elementos, manteve-se dentro do intervalo de referência (300-380 g/L) e não abaixo, como seria de esperar.

Para a população felina, dos 9 elementos que apresentaram maior grau de reticulocitose, apenas 3 demonstraram aumento do MCV (54,9, 56,5 e 55,9 fL face a um

intervalo de referência de 39-52 fL). Um dos elementos com maior resposta regenerativa apresentou MCV abaixo do intervalo de referência (37 fL). Apenas um elemento dos 9 apresentou MCHC inferior ao intervalo de referência (286 g/L para um intervalo de 300-380 g/L). O RDW caiu fora do valor de referência também em apenas um elemento (20,5% face ao intervalo 14-18%).

Adicionalmente a estes resultados, em ambos os grupos o MCV revelou macrocitose e o MCHC hipocromia em anemias não regenerativas. Há que considerar que os índices eritrocitários podem sofrer alterações face a situações que não a resposta regenerativa a uma anemia. Por exemplo, o MCV pode aumentar na diseritropoiese e o MCHC em caso de hemólise. As variáveis que afetam estes parâmetros encontram-se abordadas no tópico ‘Alterações na morfologia eritrocitária’.

Os resultados do presente estudo parecem indicar que os índices eritrocitários MCV, MCHC e RDW não são bons indicadores do grau de regeneração da anemia. Estes resultados vêm de encontro aos resultados obtidos na literatura por Tvedten (1999), Hodges & Christopher (2011) e Furman et. al. (2014). Os autores referem que os índices são incapazes de detetar baixos números de células macrocíticas, microcíticas e hipocrómicas.

A metodologia utilizada para a medição dos índices eritrocitários pode influenciar os resultados obtidos. Quando macrocitose e hipocromia foram estabelecidos como indicadores de resposta regenerativa, o cálculo dos índices era feito após determinação do hematócrito recorrendo à técnica microhematócrito. Determinado o valor, o MCV era calculado através da fórmula Hct/RBC e o MCHC através da fórmula Hb/Hct (Jain, 1979; Schalm & Kaneko, 1961). Hoje em dia estes cálculos são feitos através de equipamento automático, e diferenças entre o hematócrito calculado com microhematócrito e aquele medido pelas máquinas podem afetar os índices e respetivas sensibilidade e especificidade (Hodges & Christopher, 2011). Além disso, a impedância elétrica, princípio do equipamento utilizado para a realização dos hemogramas deste estudo, pode subestimar a contagem de eritrócitos na presença de pequenos agregados ou quando o eixo de medição não se encontra alinhado. Caso isto se verifique, o MCHC aumenta (Mohandas et. al., 1986).

O facto de não existirem intervalos de referência para o parâmetro RDW pode atuar como limitação para a avaliação da utilidade do parâmetro. Diferentes equipamentos utilizam diferentes valores e é impreterível que um intervalo seja estabelecido.

Há que considerar ainda fatores inerentes à metodologia de colheita, condições de armazenamento e transporte das amostras. Esses fatores podem ter tido influência sobre os resultados e escaparam ao controlo da autora devido à natureza retrospectiva do estudo.

Com base na contagem total de reticulócitos, a anemia regenerativa teve uma representação de 51,5% na amostra de cães e 81% na amostra de gatos. A maioria das anemias em gatos não apresenta resposta regenerativa (Tasker, 2012). Uma investigação levada a cabo por Furman et. al. (2014) com 1098 amostras de sangue de gatos anémicos obteve 57,7% de anemias não regenerativas. Os resultados obtidos no presente estudo não vão de encontro à informação presente na literatura. De destacar a diferença considerável da dimensão das amostras em questão. No conhecimento da autora, não existe, até à presente data, informação que reporte a prevalência de resposta regenerativa em cães ou números adicionais relativamente a gatos.

Relativamente à existência de resposta medular, importa relembrar que anemias hemolíticas e por hemorragia são, inicialmente, não regenerativas, podendo a prevalência de anemias regenerativas e não regenerativas, por este motivo, ter sido condicionada. O controlo desta variável implicaria um seguimento íntimo de cada caso clínico, o que não foi possível, por se tratar de um estudo retrospectivo.

A classificação segundo a etiologia resultou maioritariamente em supressão medular secundária, correspondendo a 57,6% da amostra total, com doença infecciosa ou inflamatória como principal causa. Este resultado encontra-se de acordo com aqueles obtidos por Korman et. al. (2012) e por Kohn (2001), cujas amostras apresentaram anemia maioritariamente devido a alterações da medula óssea e, em particular, por doença inflamatória, respetivamente. Estes estudos incluíram, no entanto, apenas amostra felina.

No estudo em cães anémicos levado a cabo por Chervier et. al. em 2012 a população registou anemia associada a tumores como causa principal, seguida de anemia associada a doença inflamatória. É importante mencionar, todavia, que este estudo excluiu hemorragia aguda da classificação. Estes resultados contrastam com aqueles obtidos neste estudo, onde neoplasia constituiu apenas 5% do total de animais anémicos.

As etiologias da amostra referem 34 animais com anemia por supressão medular secundária, números que não estão de acordo com os 21 animais (16 cães e 5 gatos) com ausência de regeneração. Esta ausência de concordância entre os dados parece sugerir a existência de algumas limitações associada ao historial clínico e dados dos elementos do estudo.

Não existem, até à data, mais trabalhos na literatura que reportem as etiologias de anemia, tanto quanto a autora tenha conhecimento.

Uma parte da amostra, correspondente a 29%, foi classificada como tendo anemia de etiologia desconhecida. Estes resultados constituem uma porção considerável da amostra do estudo e influenciam os resultados obtidos nos restantes parâmetros. Caso se conhecesse a etiologia da anemia dos animais em questão, os resultados obtidos nas restantes categorias seriam outros. A etiologia desconhecida deveu-se a impossibilidade de seguimento dos casos clínicos, falta de oportunidade para investigação por parte dos proprietários ou falta de informações no historial clínico dos animais.

É relevante referir que o facto de os dados terem sido obtidos a partir do mesmo CAMV pode condicionar a prevalência das etiologias, no sentido em que a variação geográfica poderá influenciar a presença ou ausência de agentes etiológicos.

Resta acrescentar que a amostra utilizada neste estudo apresentou tamanho modesto. Além disso, como a seleção de animais anémicos foi condicionada pela requisição do índice de reticulócitos, o total de animais anémicos acabou por ficar consideravelmente diminuído, não correspondendo na totalidade à realidade de animais com anemia num CAMV com elevada casuística.

7. Conclusão

A anemia é uma presença constante em animais de companhia. A informação publicada acerca da prevalência de resposta regenerativa das anemias em cães e gatos é escassa, bem como a sua classificação com base na etiologia.

A prevalência de anemias regenerativas na população de gatos deste estudo foi consideravelmente superior àquela existente na literatura, 81% face a 42,3%. Na população de cães, 51,5% apresentou resposta regenerativa. Não existem dados na literatura para a comparação da resposta regenerativa em cães e apenas um estudo em gatos aponta esta classificação como objetivo. Esse mesmo estudo não procede à categorização da resposta regenerativa consoante os diversos valores da contagem total de reticulócitos. Face a esta ausência, seria oportuno explorar estes tópicos. De salientar a reduzida população da amostra neste estudo, uma das principais limitações encontradas, tornando-se imprudente fazer extrapolações às populações canina e felina no geral.

Poucos estudos abordaram a utilidade dos índices eritrocitários, frequentemente utilizados na classificação morfológica da anemia. A informação disponível até então demonstra que a sua utilização oferece limitações à classificação.

Integrando os resultados obtidos no presente estudo com a informação disponível na literatura existente acerca do tema, parece sensato afirmar que, tanto em cães quanto em gatos, os índices eritrocitários MCV, MCHC e RDW não são bons indicadores de resposta regenerativa na presença de anemia.

A classificação morfológica não substitui a contagem total de reticulócitos, que continua a ser o *gold standard* para avaliar a existência de resposta medular. Nos casos em que este exame não se encontra disponível, a contagem de policromatófilos no esfregaço sanguíneo deve ser a segunda escolha. O índice eritrocitário RDW é preferível à observação de anisocitose no esfregaço para a avaliação do tamanho celular. É fundamental estabelecer intervalos de referência para o parâmetro em cão e gato, pois não se encontram disponíveis na literatura.

Resta frisar a importância da realização do exame esfregaço sanguíneo quando se realiza um hemograma ou, pelo menos, sempre que um animal se apresente com anemia.

8. Bibliografia

- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic Common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774), 193-197.
- Allison, R. W., & Meinkoth, J. H. (2010). Anemia Caused by Rickettsia, Mycoplasma, and Protozoa. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 199-210). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Barger, A. M. (2010). Erythrocyte Morphology. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 144-151). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Becker, M., Moritz, A., & Giger, U. (2008). Comparative clinical study of canine and Feline total blood cell count results with seven in-clinic and two comercial Laboratory hematology analyzers. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(4), 373-384.
- Bellwood, B., & Andrasik-Catton, M. (2014). *Veterinary Technician's Handbook of Laboratory Procedures*. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Bourgès-Abella, N. H., Geffré, A., Deshuillers, P. L., Braun, J. D., & Trumel, C. (2014). Changes in hematology measurements in healthy and diseased dog blood stored at room temperature for 24 and 48 hours using the XT-2000iV analyzer. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(1), 24-35.
- Cain, S. M. (1977). Oxygen delivery and uptake in dogs during anemic and hypoxic hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 42(2), 228-234.
- Chalhoub, S., Langston, C., & Eatroff, A. (2011). Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13(9), 629-640.
- Chervier, C., Cadoré, J. L., Rodriguez-Piñeiro, M. I., Deputte B. L., & Chabanne, L. (2012). Causes of anaemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 53(4), 223-227.

Christopher, M. M., & Harvey, J. W. (1992). Specialized hematology tests. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 7(4), 301-310.

Christopher, M. M., & Lee, S. E. (1994). Red cell Morphologic alterations in cats with hepatic Disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 23(1), 7-12.

Collicutt, N. B., Grindem, C. B., & Neel, A. J. (2012). Comparison of manual polychromatophilic cell and automated reticulocyte quantification in evaluating regenerative response in anemic dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(2), 256-260.

Couto, C. G. (2008). Hematology. In Nelson, R. W., & Couto, C. G., *Small Animal Internal Medicine* (4th ed., pp. 1209-1278). St. Louis: Mosby Elsevier.

Cowell, R. L. (2007). *Regenerative Anemia*. 79th Western Veterinary Conference, Las Vegas, Nevada, USA.

Cowgill, E. S., Neel, J. A., & Grindem, C. B. (2003). Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(6), 1223-1244.

Day, M. J. (2010). Immune-Mediated Anemias in the Dog. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 216-225). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Erslev, A. J., & Besareb, A. (1997). Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney International*, 51(3), 622-630.

Failace, R. (2009). *Hemograma – Manual de Interpretação*. Porto Alegre: Artmed Editora.

Fernandez, F., & Grindem, C. (2006). Reticulocyte response. In: Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, N. C., & Schalm, O. W., *Schalm's Veterinary Hematology* (5th ed., pp. 110-116). Iowa, Ames: Blackwell Publishing.

Fisher, J. W. (2003). Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Experimental Biology and Medicine*, 228(1), 1-14.

Fleischman, W. (2012). Anemia: Determining the Cause. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, 34(6), E1.

Frowde, P. E., Gow, A. G., Burton, C. A., Powell, R., Lipscomb, V. J., House, A. K., et. al. (2014). Hepatic Hecpidin Gene Expression in Dogs with a Congenital Portosystemic Shunt. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(4), 1203-1205.

Furman, E., Leidinger, E., Hooijberg, E. H., Bauer, N., Beddies, & Moritz, A. (2014). A Retrospective Study of 1,098 Blood Samples with Anemia from Adult Cats: Frequency, Classification, and Association with Serum Creatinine Concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), 1391-1397.

Graham, M. D. (2003). The Coulter Principle: Foundation of an Industry. *Journal of the Association of Laboratory Automation*, 8(6), 72-81.

Harvey, J. W. (1997). The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L., *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (5th ed., pp. 197-204). San Diego: Academic Press.

Harvey, J. W. (2008). Understanding Reticulocyte Counts in Cats – Classify your Feline anemias correctly. *IDEXX Laboratories*, 2 (1), 16-17.

Hodges, J., & Christopher, M. M. (2011). Diagnostic accuracy of using erythrocyte índices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(11), 1452-1458.

Hoff, B., Lumsden, J. H., & Valli, V. E. (1985). Na appraisal of bone marrow biopsy in assessment of sick dogs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 49(1), 34-42.

Horobin, R. W., & Walter, K. J. (1987). Understanding Romanowsky staining. *Histochemistry*, 86(3), 331-336.

INNO. (2011, 19 de setembro). Glossário [texto colocado no Blog innoanimalcare.blogspot.pt] enviado para innoanimalcare.blogspot.pt/2011/09/cuteness.html. Acedido em 14 de Abril de 2015.

Jain, N. C. (1979). Hematologic characteristic of anemia, part II: interpretive aspects. *California Veterinarian*, 33, 15-18.

Jain, N. C. (1986). The dog: Normal hematology with comments on response to disease. In Jain, N. C., *Schalm's Veterinary Hematology* (4th ed., pp 103-125). Philadelphia: Lea & Febiger.

Jain, N. C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kohn, B. (2001). Erythrocyte studies in healthy and anaemic cats. Dissertação apresentada à Free University of Berlin.

Korman, R. M., Hetzel, N., Knowles, T. G., Harvey, A. M., & Tasker, S. (2012). A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(2), 81-90.

Laber, J., Perman, V., & Stevens, J. B. (1974). Polychromasia or reticulocytes – na assessment of the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 10, 399-406.

Lopes, S. T. A., Biondo, A., & Santos, A. P. (2007). *Manual de Patologia Clínica Veterinária*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria.

Macintire, D. K., Boudreaux, M. K., West, G. D., Bourne, C., Wright, J. C., & Conrad, P. A. (2002). *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(3), 2581-2585.

Maiese, K., Chong, Z. Z., & Shang, Y. C. (2008). Raves and Risks for erythropoietin. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(2), 145-155.

Mills, J. N. (1998). Interpreting blood smears (or What blood smears are trying to tell you!). *Australian Veterinary Journal*, 76(9), 596-600.

Mills, J. (2000). Anaemia. In Day, M., Mackin, A., & Littlewood, A., *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine* (2nd ed., pp. 29-41). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Mohandas, N., Kim, Y. R., Tycko, D. H., Orlik, J., Wyatt, J. & Groner, W. (1986). Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin Concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood*, 68(2), 506-513.

Moritz, A., Fickenscher, Y., Meyer, K., Failing, K., & Weiss, D. (2004). Canine and Feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 32-38.

Moritz, A., & Becker, M. (2010). Automated Hematology Systems. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 1054-1066). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Moritz, A., & Tvedten, H. (2010). Reticulocyte and Heinz Body Staining and Enumeration. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 1067-1073). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Neiger, R., Hadley, J., & Pfeiffer, D. U. (2002). Differentiation of dogs with regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume. *Veterinary Record*, 150(14), 431-434.

O'Keefe, D. A., & Schaeffer, D. J. (1992). Hematologic toxicosis associated with doxorubicin administration in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(5), 276-282.

- Olver, C. S. (2010). Erythropoiesis. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 36-42). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Perkins, P. C., Grindem, C. B., & Cullins, L. D. (1995). Flow cytometric analysis of punctate and aggregate reticulocyte responses in phlebotomized cats. *American Journal of Veterinary Research*, 56(12), 1564-1569.
- Pierre, R. V. (2002). Reticulocytes – Their Usefulness and Measurement in Peripheral Blood. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22(1), 63-79.
- Ramsey, I., & Gould, S. (1999). Feline Anemia 1. Clinical signs and investigation. *In Practice*, 21(8), 411-415.
- Rebar, A. H. (2003). *Interpretación del hemograma Canino y Felino*. Wilmington, Delaware: Nestlé Purina PetCare Company.
- Reece, W. O. (2006). *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Reimer, M. E., Troy, G. C., & Warnick, L. D. (1999). Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(5), 384-391.
- Riley, R. S., Bem-Ezra, J. M., Goel, R., & Tidwell, A. (2001). Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 15(5), 267-294.
- Schalm, O. W., & Kaneko, J. J. Laboratory notes. *California Veterinarian*, 3, 16-18.
- Smith, J. E., Moore, K., Arens, M., Rinderknecht, G. A., & Ledet, A. (1983). Hereditary elliptocytosis with protein band 4.1 deficiency in the dog. *Blood*, 61(2), 373-377.
- Stokol, T. (2010). Immune-Mediated Anemias in the Cat. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 226-232). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Tasker, S. (2012). Diagnostic approach to anaemia in cats. *In Practice*, 34(7), 370-381.

Thrall, M. A. (2012a). Classification of and Diagnostic Approach to Polycythemia. In Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W., *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 114-117). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Thrall, M. A. (2012b). Erythrocyte Morphology. In Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W., *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 61-74). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Thrall, M. A. (2012c). Nonregenerative Anemia. In Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W., *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 81-86). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Thrall, M. A. (2012c). Regenerative Anemia. In Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W., *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 87-113). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Torrance, A. (2000). Overview of Haematological Diagnostic Techniques. In Day, M., Mackin, A., & Littlewood, A., *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine* (2nd ed., pp. 3-17). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Tvedten, H. (1999). Morphologic Classification of Anemia. *Veterinary Clinical Pathology*, 28(3), 80-82.

Tvedten, H. (2010). Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In Weiss, D. J., & Wardrop, K. J., *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp 152-161). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Villiers, E. (2000). Polycythemia. In Day, M., Mackin, A., & Littlewood, A., *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine* (2nd ed., pp. 43-49). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Voigt, G. L. (2000). *Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians*. Ames, Iowa: Iowa State University Press.

Wagner, J. E. (1975). Cytauxzoon in domestic cats (*Felis domestica*) in Missouri. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 167:874

Wallach, J. (2003). *Interpretação de exames laboratoriais*. Rio de Janeiro: Medsi.

Weiser, G. (2012a). Introduction to Leukocytes and the Leukogram. In Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W., *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 118-122). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Weiser, G. (2012b). Laboratory Technology for Veterinary Medicine. In Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W., *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 3-33). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Weiser, G. (2012c). Sample Collection, Processing, and Analysis of Laboratory Service Options. In Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W., *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed., pp. 34-39). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Werner, L. L., & Gorman, N. T. (1984). Immune-mediated disorders of cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 14(5), 1039-1064.

White, C., & Reine, N. (2009). Feline Nonregenerative Anemia: Pathophysiology and Etiologies. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, 31(7), E1-E7.

Willi, B., Boretti, F. S., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M. L., Reusch, C., et. al. (2005). Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2581-2585.

Wilson, R. (2011). Practical assessment of blood smears in dogs and cats. *In Practice*, 33(8), 402-409.

Zabolotzky, S. M., & Walker D. B. (2014). Peripheral Blood Smears. In Cowell, R. & Valenciano, A., *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (4th ed., p. 458). St. Louis: Elsevier.

APÊNDICES

APÊNDICE I – DADOS DA POPULAÇÃO CÃES

APÊNDICE II – DADOS DA POPULAÇÃO GATOS

APÊNDICE I – Dados da população cães

ID	Eritrócitos (x10 ¹² /L)	Hemoglobina (g/L)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW (%)	Total Reticulócitos (x10 ⁴ /μL)	% Reticulócitos	Resposta regenerativa
1	2,7	66	20,1	74,6	24,4	328	11,4	3,02	0,99	0
2	3,62	95	27,2	75,2	26,2	349	13,4	1,05	0,27	0
3	1,93	50	17,6	91,5	25,9	284	19,7	5,68	3,36	0
4	3,22	61	18,9	58,7	18,9	322	18,1	8,72	2,75	1
5	5,54	99	31,5	69,6	21,8	314	16,4	7,06	1,44	1
6	3,45	85	26,7	77,5	24,6	318	14,2	42,3	12,75	2
7	3,71	90	26,1	70,5	24,2	344	13,1	11,1	2,9	1
8	3,71	87	25,4	68,7	23,5	342	13,1	17,5	4,3	2
9	3,31	72	22,3	67,4	21,7	322	18,5	12	3,45	1
10	3,39	70	22,9	67,7	20,6	305	19,5	10,4	3	1
11	5,3	128	36,6	69,2	24,1	349	11,4	2	0,37	0
12	2,57	63	17	66,2	24,5	370	12,1	11,4	4,52	1
13	3,82	100	26,4	69,2	26,1	378	13,8	15	3,78	1
14	1,77	45	12,7	72	25,4	354	11	0,63	0,36	0
15	4,08	86	25,3	62,2	21	339	16,7	2,46	0,57	0
16	3,29	68	20,8	63,3	21,3	332	16,7	16,2	4,59	2
17	4,09	77	26,1	64	22	357	15,6	24,1	5,77	2
18	3,39	80	23,4	69,3	23,5	341	11,7	6,56	1,97	1
19	4,16	104	30,9	74,5	25	336	11	3,6	0,87	0
20	4,23	108	29,3	69,4	25,5	368	12,6	6	1,3	0
21	3,04	75	22,4	74	24,6	334	11,1	3,6	1,17	0
22	3,43	68	20,7	60,5	19,8	328	16,1	4,15	1,3	0
23	2,64	61	18,4	70	23,1	331	15,5	0,87	0,31	0

24	3,13	72	24	76,7	23	300	12	9,1	4,69	1
25	4,9	118	32,3	66	24	365	11,5	1,14	0,21	0
26	3,95	98	27	68,5	24,8	362	10	4,66	0,77	0
27	4	88	25,7	64,3	22	342	13,9	4,8	1,16	0
28	3,22	72	19,6	61	22,3	367	15,5	6,62	1,68	1
29	4,29	92	29,4	68,6	21,4	312	12,5	6,57	1,41	1
30	4,01	78	23,6	58,9	17,2	330	14,9	31,6	9,1	2
31	5,31	112	32,4	61,2	21	345	14,3	3,68	0,67	0
32	5,75	141	37,1	64,6	24,5	380	14,7	7,81	1,16	1
33	4,21	93	27,1	64,4	22	343	13,6	1,85	0,44	0

APÊNDICE II – Dados da população gatos

ID	Eritrócitos (x10 ¹² /L)	Hemoglobina (g/L)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW (%)	Total Reticulócitos (agreg.) (x10 ⁴ /μL)	% Reticulócitos agregados	Resposta regenerativa
1	3,93	65	19,1	48,7	16,5	340	15	1,5	0,38	1
2	4,24	65	18,4	43,6	15,3	353	14,7	3,26	0,7	1
3	3,15	49	13,8	43,9	15,5	355	14,5	2	0,59	1
4	4,01	54	14,8	37	13,4	364	16,7	9,74	2,15	2
5	3,29	57	18	54,9	17,3	316	15,5	16,7	5,78	2
6	5,08	75	22,9	45,2	14,7	327	14,6	2,86	0,55	1
7	5,72	84	27,9	48,8	14,6	301	16,3	9,48	2,03	2
8	3,4	61	17,4	51,2	17,9	350	19,4	3,36	0,93	1
9	3,26	68	18,4	56,5	20,8	369	20,5	10	2,69	2
10	1,76	33	9,2	52,3	18,7	358	19,9	1	0,56	0
11	2,5	45	14,6	58,5	18	308	15,9	0,67	0,19	0
12	4,21	54	15,7	37,5	12,8	343	18,4	2,3	0,5	1
13	2,81	43	13	46,6	15,3	330	15,6	6,5	1,68	2
14	2,69	57	15,7	58,4	21,1	363	19,9	3,78	1,52	1
15	5,03	78	22,7	45,3	15,5	343	17,4	0,64	0,17	0
16	2,76	46	15,5	56,3	16,6	296	14,2	2,42	0,8	1
17	4,95	81	23	54,8	16,3	298	14,9	0,51	0,95	0
18	3,28	46	14,4	44,2	14	319	14,5	6,55	1,91	2
19	3,65	67	18,8	51,7	18,3	356	15,4	12	3,1	2
20	3,66	64	18,6	51	17,4	344	15,7	1,19	0,31	0
21	4,53	80	22,9	50,7	17,6	349	14,1	3,28	0,7	1
22	4,74	90	28	59,1	18,9	321	16,7	2,77	0,55	1
23	3,13	58	17,7	56,7	18,5	327	16,9	2,08	0,69	1
24	2,41	38	10	41,7	15,7	380	16,3	6,1	0,73	2

25	4,12	64	17,1	41,6	15,5	374	15,9	1,76	0,46	1
26	3,95	63	22	55,9	15,9	286	17,5	5,93	1,44	2